

• 实验研究 •

白藜芦醇通过抑制 HIF-1 α /PKM2 减少大鼠继发性脊髓损伤及小胶质细胞糖酵解的机制研究

冯天保^{1,2}, 王阿茜³, 胡佳婷¹, 闫龙³, 马宇莘¹, 贺晶², 谢咪¹, 施彩珍¹, 王璐^{1*}

1. 延安大学 医学院, 陕西 延安 716000

2. 延安大学附属医院, 陕西 延安 716000

3. 延安市中医医院, 陕西 延安 716099

摘要: **目的** 研究白藜芦醇通过缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)/磷酸果糖激酶 (PFK) 信号轴减少小胶质细胞糖酵解, 促进大鼠脊髓损伤后的神经修复过程的作用机制。**方法** 选用 SD 大鼠构建继发性脊髓损伤模型, 在模型基础上 ip 白藜芦醇 (25、50、100 mg/kg) 干预 7 d, 甲苯胺蓝和 HE 染色观察脊髓组织中尼氏小体数量和组织病变; ELISA 检测脊髓组织炎症因子白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量; 免疫荧光染色观察脊髓组织 HIF-1 α 在离子钙结合衔接分子 1 (IBA-1) 表达和定位; 蛋白质印迹检测脊髓组织 M1 标志物[诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、CD86]、M2 标志物[精氨酸酶 (Arg1)、CD163]、HIF-1 α 、肌肉丙酮酸激酶同工酶 (PKM2)、葡萄糖转运蛋白 3 (GLUT3)、己糖激酶 (HK)-1 和乳酸脱氢酶 A (LDHA) 蛋白表达。构建脂多糖 (LPS) 诱导小鼠小胶质细胞 (BV2) 炎症模型, 在 LPS (100 ng/mL) 基础上加入白藜芦醇 (30 μ mol/L) 和 HIF-1 α 激动剂 (DMOG, 1 mmol/L) 干预 24 h。CCK-8 检测细胞活性, 免疫荧光检测细胞中 CD86 和 CD163 阳性表达; ELISA 检测细胞炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量; 蛋白质印迹检测 HIF-1 α 、PKM2、GLUT3、HK-1、LDHA 的蛋白表达水平。**结果** 与模型组比较, 白藜芦醇组组织病变减轻, 尼氏小体数量增加, 组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、iNOS、CD86、HIF-1 α 、PKM2、GLUT3、HK-1、LDHA 水平降低, Arg1、CD163 水平升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 细胞结果显示, 与模型组比较, 白藜芦醇组细胞中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、CD86、HIF-1 α 、PKM2、GLUT3、HK-1、LDHA 水平降低, CD163 水平升高 ($P < 0.01$)。HIF-1 α 激动剂 DMOG 可以抑制白藜芦醇上述效果。**结论** 白藜芦醇通过抑制 HIF-1 α /PKM2 介导的糖酵解代谢重编程, 调控小胶质细胞 M2 型极化倾向, 进而减轻脊髓损伤后炎症损伤。

关键词: 脊髓损伤; 白藜芦醇; 巨噬细胞极化; 低氧诱导因子; 磷酸果糖激酶; 炎症

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2025)06-1345-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.06.001

Mechanism of resveratrol in attenuating secondary spinal cord injury and microglial glycolysis in rats via inhibition of HIF-1 α /PKM2 signaling

FENG Tianbao^{1,2}, WANG Aqian³, HU Jiating¹, YAN Long³, MA Yushen¹, HE Jing², XIE Mi¹, SHI Caizhen¹, WANG Lu¹

1. School of Medicine, Yan'an University, Yan'an 716000, China

2. The Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, China

3. Yan'an Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yan'an 716099, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of resveratrol promotes the nerve repair process after spinal cord injury by reducing microglia glycolysis through HIF-1 α /PKM2 signaling axis. **Methods** Spinal cord injury model was established by using SD rats, and the rats were intraperitoneally injected with resveratrol (25, 50, and 100 mg/kg) for 7 days. Toluidine blue and HE staining

收稿日期: 2025-04-16

基金项目: 延安市科技计划项目 (2023-SFGG-039)

作者简介: 冯天保, 男, 研究方向为神经生物学。E-mail: yuyuxiongxiang521@163.com

*通信作者: 王璐, 研究方向为临床医学。E-mail: 15291110001@163.com

were used to observe the number and pathological changes of Nissl bodies in the spinal cord tissue. ELISA was used to detect the content of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in spinal cord tissue. Immunofluorescence staining was used to observe the expression and localization of HIF-1 α at IBA-1 protein. The protein expressions of M1 markers (iNOS, CD86), M2 markers (Arg1, CD163), HIF-1 α , PKM2, GLUT3, HK-1, and LDHA in spinal cord tissue were detected by Western blotting. Microglia (BV2) inflammation model induced by lipopolysaccharide (LPS) was established, and resveratrol (30 mmol/L) and HIF-1 α agonist (DMOG, 1 mmol/L) were added to LPS (100 ng/mL) for 24 h. CCK-8 was used to detect the cell viability, and immunofluorescence was used to detect the protein expression of CD86 and CD163 in the cells. ELISA was used to detect the levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α . The protein expression levels of HIF-1 α , PKM2, GLUT3, HK-1, and LDHA were detected by Western blotting. **Results** Compared with the model group, resveratrol groups alleviated the tissue lesions, increased the number of Nissl bodies, and decreased the levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , iNOS, CD86, HIF-1 α , PKM2, GLUT3, HK-1, and LDHA in the tissues, the levels of Arg-1 and CD163 were increased ($P < 0.05, 0.01$). Cell results showed that compared with the model group, the levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , CD86, HIF-1 α , PKM2, GLUT3, HK-1, and LDHA in the cell supernatant were decreased, but the level of CD163 was increased ($P < 0.01$). HIF-1 α agonist DMOG could inhibit the above effects of resveratrol. **Conclusions** Resveratrol can regulate the M2 polarization of microglia by inhibiting HIF-1 α /PKM2-mediated glycolytic metabolic reprogramming, thereby alleviating inflammatory injury after spinal cord injury.

Key words: resveratrol; spinal cord injury; macrophage polarization; HIF-1 α ; PKM2; inflammation

脊髓损伤作为累及中枢神经系统的严重创伤性疾病,常引发损伤平面以下不可逆性神经功能缺损及运动感觉功能丧失,具有高致残率与病死率特征。脊髓损伤病理进程可分为原发性机械损伤与继发性病理损伤 2 个阶段:前者由外部暴力直接作用于脊髓组织所致,后者则在原发损伤基础上启动级联病理反应,涉及炎症介质释放、氧化应激失衡、自噬异常及细胞凋亡通路激活,最终导致血-脊髓屏障破坏、局部缺血坏死及进行性神经功能恶化^[1]。尽管现行脊髓损伤治疗方案主要包括外科减压、药物干预及物理康复等手段,仍存在疗效局限与不良反应显著等弊端^[2],故探索新型治疗靶点具有重要临床意义。

脊髓损伤的病理机制涉及复杂神经炎症网络,如小胶质细胞/星形胶质细胞异常活化、外周巨噬细胞浸润、促炎-抗炎平衡破坏及氧化应激损伤等过程共同构成恶性循环^[3-4]。研究表明,脊髓损伤后氧化应激可抑制线粒体氧化磷酸化与糖酵解代谢,导致能量代谢障碍并加剧继发性损伤^[5]。缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 作为糖酵解关键调控因子,在缺血缺氧微环境中通过上调己糖激酶 (HK)、磷酸果糖激酶 (PFK) 等限速酶表达促进糖酵解代偿,但过度激活可能引发乳酸堆积、自由基过量生成等代谢性酸中毒现象^[6-7]。还有研究表明,HIF-1 α 和肌肉丙酮酸激酶同工酶 (PKM2) 在糖酵解中存在协同作用,HIF-1 α 通过结合 PKM 基因启动子区域进行转录调控,当 PKM2 进入细胞核后,与 HIF-1 α 形成复合物,增强 HIF-1 α 对糖酵解靶基因的转录激^[8-9]。

因此,靶向调控 HIF-1 α -糖酵解信号轴可能为改善脊髓损伤病理进程提供新思路。

近年来,天然药物单体在神经保护领域展现出潜在价值。白藜芦醇作为存在于葡萄、虎杖等植物的多酚类化合物,具有抗炎、抗氧化及代谢调节等多重药理活性^[10-12]。研究表明白藜芦醇可通过清除活性氧 (ROS)、抑制脂质过氧化及调节磷酸三腺苷合酶活性等途径改善氧化应激损伤^[13]。Tang 等^[14]研究证实,白藜芦醇在抗氧化防御系统和促进神经元再生方面具有显著的生物学效应;Ni 等^[15]通过系统的动物实验证实,白藜芦醇能够显著改善脊髓损伤后的运动功能恢复。小胶质细胞作为中枢神经系统中重要的免疫效应细胞,脊髓损伤后,这些细胞可迅速激活并释放大促炎细胞因子,同时促进 ROS 生成,从而加剧继发性神经损伤的病理进程^[16]。因此,通过靶向抑制脊髓损伤后小胶质细胞调控神经炎症反应,对于改善脊髓损伤的治疗效果及患者预后具有重要的临床意义。

值得注意的是,白藜芦醇对 HIF-1 α 信号通路具有调控作用:一方面通过抑制 HIF-1 α 蛋白合成或促进其泛素化降解降低其表达水平^[17];另一方面在低氧条件下可调控 HIF-1 α 信号轴改善糖脂代谢紊乱,如白藜芦醇通过抑制 Rho/Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 (Rho/ROCK) 通路缓解细胞缺氧环境,减少 HIF-1 α 表达,进而改善缺氧环境中的糖脂代谢紊乱^[18]。脊髓损伤由于氧化应激损伤导致细胞和组织出现能量代谢障碍,因此提示白藜芦醇可能通过干预 HIF-1 α /PKM2 介导的糖酵解代谢途径调

控小胶质细胞极化表型,进而抑制继发性炎症反应。基于此,本研究拟构建大鼠脊髓击打损伤模型及脂多糖(LPS)诱导的BV2小胶质细胞炎症模型,拟在脊髓损伤模型中验证白藜芦醇对HIF-1 α /PKM2/糖酵解轴的调控,从而探讨白藜芦醇对脊髓损伤后神经功能修复的作用及HIF-1 α /PKM2信号通路介导糖酵解的可能机制,有望为临床转化提供理论依据,为开发脊髓损伤治疗策略奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

30只SPF级SD大鼠(6~8周龄,雌性,体重200~220g)由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,生产许可SCXK(京)2024-0001。实验动物饲养于延安大学医学院实验室,所有操作遵循3R原则,由延安大学附属医院实验动物伦理委员会审批通过(审批号A-2025006)。

1.2 实验细胞

小鼠小胶质细胞(BV2)购自iCell公司。

1.3 主要试剂

白藜芦醇(质量分数>99%)购自上海麦克林生化科技股份有限公司(货号R817263);LPS购自北京索莱宝科技有限公司(货号L8880);二甲基乙二酰氨基乙酸(DMOG)购自美国MedChemexpress生物科技公司(货号HY-15893)。BCA蛋白检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司(货号P0009);大鼠白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA检测试剂盒均购自上海茁彩生物科技有限公司(货号ZC-36391、ZC-36404、ZC-37624)。CD86、CD163、葡萄糖转运蛋白3(GLUT3)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、乳酸脱氢酶A(LDHA)、PKM2抗体购自杭州华安生物技术有限公司(货号ET1606-50、ER1804-03、ET1704-59、ER1706-89、ER00702、R1603-5);精氨酸酶(Arg1)和HK-1购自武汉三鹰生物技术有限公司(货号16001-1-AP、19662-1-AP);HIF-1 α 和 β -actin购自武汉爱博泰克生物科技有限公司(货号A6265、AC026);HIF-1 α 免疫荧光抗体购自北京博奥森生物技术有限公司(货号BS-0737R),离子钙结合衔接分子1(IBA-1)免疫荧光抗体购自成都正能生物技术有限公司(货号R382207);CD86免疫荧光抗体购自艾博抗(上海)贸易有限公司(货号ab239075);甲苯胺蓝和伊红购自合肥博美生物科技有限责任公司(货号JT8570、YE2080);苏木素购自

西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司(货号H9627)。

1.4 主要仪器

HI-0400脊髓打击器(美国赞德仪器有限公司)。SPW-6S蛋白质电泳电源(武汉赛维尔生物科技有限公司)。JY-SCZ4+型垂直电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司)。SQS-600P扫描影像系统(深圳市生强科技有限公司)。ELx800酶标仪(美国博腾仪器有限公司)。5200 Multi全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司)。

1.5 大鼠脊髓损伤模型构建

各组大鼠禁食禁水24h后,参考徐纪伟等^[19]大鼠脊髓损伤处理方法进行造模。大鼠取俯卧位固定于手术操作台,在T9~T10棘突背部正中直切开皮肤,钝性分离皮下筋膜,充分暴露T9~T11的棘突、椎间孔及两侧的关节突,去除T10椎板,暴露硬脊膜,使用打击器击打脊髓节段,打击力度设为200 kdyn/cm²,造成大鼠急性损伤模型,假手术组仅进行去除T10椎板不进行击打处理。分层缝合大鼠肌肉和皮肤,之后将大鼠置于电热毯上,待其苏醒后回笼饲养。术后注意大鼠的饲养环境,保持垫料的干净舒适,每天3次膀胱按摩辅助大鼠排尿,生理盐水清洗尿道口,直到大鼠恢复自主排尿。造模成功标志:打击后脊髓组织局部充血水肿,大鼠出现摆尾、双下肢回缩扑动合并弛缓性瘫痪,Basso-Beattie-Bresnahan(BBB)评分降低。BBB运动评分量表评分范围:0~21分,完全性弛缓性截瘫至功能正常是运动功能恢复的敏感指标^[20]。

1.6 动物分组与给药

将大鼠分为假手术组、模型组、白藜芦醇(25、50、100 mg/kg)组^[21]。造模完成后,白藜芦醇组大鼠ip 5、10、20 mg/mL的白藜芦醇(白藜芦醇使用1%DMSO溶解),假手术组和模型组大鼠ip 1%DMSO溶液(5 mL/kg)。各组动物24 h给药1次,连续给药7 d。各组大鼠末次给药后1 h,腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,取俯卧位,暴露脊柱,选择损伤部位对应的脊髓节段,去除椎板,暴露脊髓,将损伤部位的脊髓完整取出。

1.7 组织病理学检测

各组大鼠脊髓组织置于10%中性甲醛固定液固定,然后放入配置好的10%EDTA脱钙液进行脱钙处理,然后进行常规梯度脱水(梯度酒精-透明剂-石蜡)处理,制备石蜡切片。将石蜡切片脱蜡后分别使用苏木精(10 min)、伊红染液(3 min)

和甲苯胺蓝染色 (3 min) 处理, 染色后重复常规化梯度脱水步骤, 石蜡重新固封, 显微镜下观察组织病变和尼氏体数量。

1.8 ELISA 检测大鼠脊髓组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量

收集干预完成的大鼠脊髓组织, 加入磷酸盐缓冲液研磨制成 10% 组织匀浆。按 ELISA 试剂盒说明书操作检测组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量。

1.9 免疫荧光染色检测脊髓组织

将脊髓组织石蜡切片脱蜡处理, 微波修复 20 min, 加入 3% 双氧水阻断 15 min, 使用牛血清室温封闭 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育一抗 (HIF-1 α 抗体浓度 1:100), PBS 清洗后室温孵育二抗 (HRP 标记山羊抗兔, 浓度 1:100) 50 min, 滴加 TSA (CY3-Tyramide) 室温孵育 10 min, 清洗后重复微末修复, 进行同法孵育第二种抗体 (IBA-1 抗体浓度 1:100), 孵育完成后滴加 DAPI 复染细胞核, 最后使用抗荧光淬灭封片剂封片, 进行镜下观察。收集 BV2 细胞接种于 12 孔板中 (孔中加入玻片), 干预完成后制成细胞爬片, 同法进行免疫荧光染色。

1.10 蛋白质印迹检测脊髓组织蛋白表达

将干预完成的大鼠脊髓组织进行蛋白质裂解处理, 提取总蛋白, 经过 BCA 蛋白质定量后, 加入上样缓冲液稀释 4 倍, 进行 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热变性 10~15 min。使用凝胶电泳分离目的蛋白, 将目的蛋白电转移到 PVDF 膜上, 使用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1~2 h。加入一抗稀释液中 (Arg1, 1:5000; CD86, 1:2000; CD163, 1:500; GLUT3, 1:5000; HIF-1 α , 1:1000; HK-1, 1:2000; iNOS, 1:1000; LDHA, 1:5000; PKM2, 1:1000; β -actin, 1:5000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育, TBST 漂洗完毕后室温孵育二抗 2 h。TBST 漂洗后滴加 ECL 曝光试剂, 全自动化学发光图像分析系统下曝光拍照。

1.11 细胞分组与干预

细胞实验分为 2 部分: 分组 1: 对照组、模型组 (LPS 100 ng/mL) 组^[22]、白藜芦醇 (10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$) 组。分组 2: 对照组、模型组 (LPS 100 ng/mL)、白藜芦醇 (30 $\mu\text{mol/L}$) 组、白藜芦醇 (30 $\mu\text{mol/L}$) + HIF-1 α 激动剂 (DMOG 1 mmol/L) 组^[23]。

1.12 细胞活性实验 (CCK-8)

细胞干预完成后, 吸弃上清, 加入 CCK-8 工作液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温继续培养 2 h, 检测 450 nm

波长的吸光度 (A) 值。

1.13 ELISA 检测 BV2 细胞上清液 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量

收集各组 BV2 细胞上清液, 按 ELISA 试剂盒说明书操作检测组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量。

1.14 免疫荧光染色检测 BV2 细胞

收集 BV2 细胞接种于 12 孔板中 (孔中加入玻片), 干预完成后制成细胞爬片, 磷酸酶缓冲液清洗后, 按照 1.9 项下方法进行免疫荧光检测。一抗浓度 CD86 (1:800)、CD163 (1:200)。

1.15 蛋白质印迹检测 BV2 细胞蛋白表达

收集 BV2 细胞进行蛋白质裂解处理, 提取总蛋白, 按照 1.10 方法检测 HIF-1 α 、PKM2、GLUT3、HK-1 和 LDHA 蛋白表达水平。

1.16 统计分析

数据使用 Graphpad Prism 9.0 软件进行统计分析, 均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 方差齐则进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验, 方差不齐则使用 Brown-Forsythe 检验。

2 结果

2.1 白藜芦醇对大鼠脊髓组织神经元损伤的影响

HE 结果显示, 假手术组脊髓组织由中央部的灰质和周围部白质组成, 结构正常、各级神经元无变性或坏死, 亦未见明显胶质细胞增生; 模型组出现明显片状坏死和炎性细胞浸润灶; 白藜芦醇干预后损伤情况减轻, 见图 1。

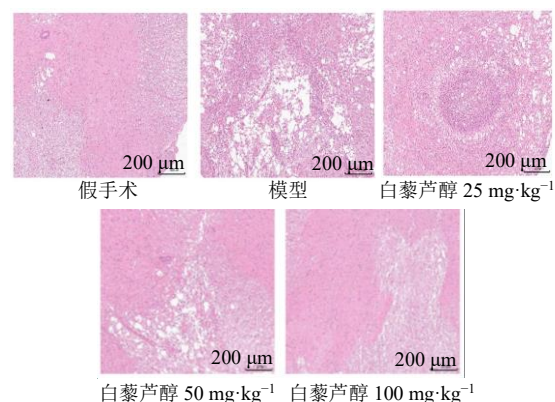


图 1 各组大鼠脊髓组织病变情况 (A, HE 染色, $\times 100$) 及 BBB 评分变化情况 (B)

Fig. 1 Lesion conditions of spinal cord tissues in each group of rats (A, HE staining, $\times 100$) and the changes in BBB scores (B)

BBB 结果显示,治疗 3 d 后模型组大鼠 BBB 评分显著降低,白藜芦醇干预后 BBB 评分逐渐升高 ($P<0.01$),见表 1。甲苯胺蓝染色结果显示,与模型组比较,白藜芦醇组脊髓组织尼氏体阳性神经元数量增加 ($P<0.01$),呈剂量相关性,见图 2。

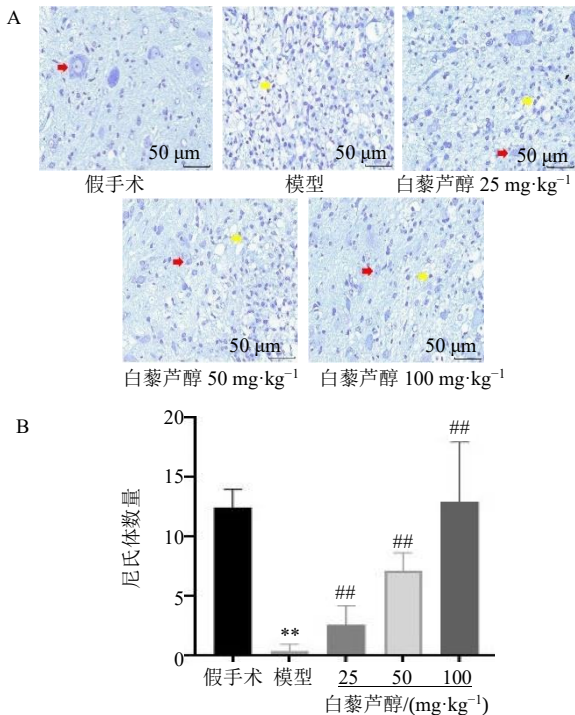
表 1 各组大鼠 BBB 评分变化情况 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Changes in BBB scores of rats in each group($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	浓度/(mg·kg ⁻¹)	BBB 评分				
		治疗前	治疗后 1 d	治疗后 3 d	治疗后 5 d	治疗后 7 d
假手术	—	21.0±0.0	21.0±0.0	21.0±0.0	21.0±0.0	21.0±0.0
模型	—	21.0±0.0	0.0±0.0	1.0±0.0**	1.3±0.6**	2.3±0.6**
白藜芦醇	25	21.0±0.0	0.0±0.0	1.3±0.6	2.0±0.0 [#]	2.7±0.6
	50	21.0±0.0	0.0±0.0	2.0±0.0 ^{##}	2.3±0.6 ^{##}	3.7±0.6 ^{##}
	100	21.0±0.0	0.0±0.0	2.0±0.6 ^{##}	3.0±1.0 ^{##}	5.7±0.6 ^{##}

与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs sham operation group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group.



红色箭头为尼氏小体,黄色箭头为变性萎缩神经元。与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P<0.01$ 。

The red arrows represent Nissl bodies, and the yellow arrows represent degenerate and atrophied neurons. ** $P<0.01$ vs sham operation group; ^{##} $P<0.01$ vs model group.

图 2 各组大鼠脊髓组织中尼氏体数量变化情况 (A, 甲苯胺蓝染色, $\times 100$) 及尼氏体统计情况 (B)

Fig. 2 Changes in the number of Nissl bodies in the spinal cord tissues of the group of rats (A, toluidine blue staining, $\times 100$) and statistics of Nissl bodies (B)

2.2 白藜芦醇对大鼠脊髓组织中炎症因子含量及脊髓组织蛋白表达的影响

ELISA 结果显示,与模型组比较,白藜芦醇 (50、100 mg/kg) 组大鼠脊髓组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量显著降低 ($P<0.05$ 、0.01),见图 3。

蛋白质印迹检测结果显示,与模型组比较,白藜芦醇组脊髓组织中 iNOS 和 CD86 蛋白表达量显著降低,Arg1 和 CD163 蛋白表达量显著升高 ($P<0.01$),呈剂量相关性,见图 4。

2.3 白藜芦醇对大鼠脊髓组织中 HIF-1 α 、IBA-1 荧光表达及 HIF-1 α /PKM2 和糖酵解通路蛋白表达的影响

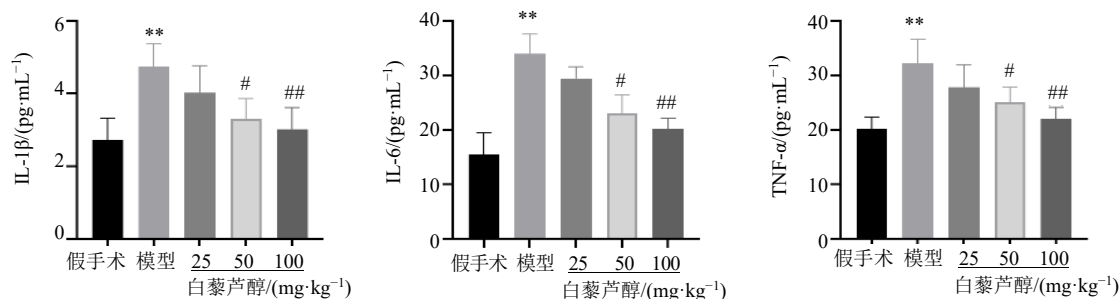
免疫荧光结果显示,与模型组比较,白藜芦醇组脊髓组织中 HIF-1 α 、IBA-1 阳性表达水平显著降低 ($P<0.01$),呈剂量相关性,见图 5。

蛋白质印迹检测结果显示,与模型组比较,白藜芦醇组脊髓组织中 HIF-1 α 、PKM2、GLUT3、HK-1、LDHA 蛋白表达量均显著降低 ($P<0.01$),呈剂量相关性,见图 6。

2.4 白藜芦醇对 LPS 诱导 BV2 细胞脊髓损伤模型的影响

CCK-8 检测结果显示,与对照组比较,模型组 BV2 细胞活性显著降低 ($P<0.01$),白藜芦醇干预后细胞活性显著升高,其中 30 μ mol/L 白藜芦醇对细胞活性的促进效果最佳,后续均使用 30 μ mol/L 白藜芦醇进行实验,见图 7。

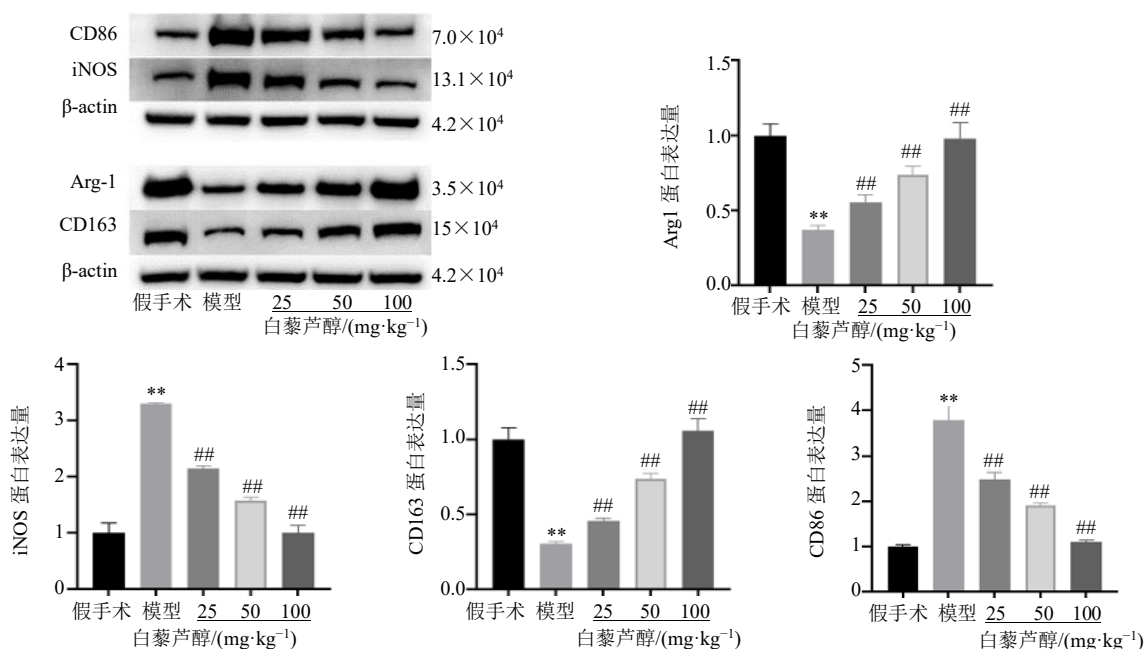
ELISA 结果显示,与对照组比较,模型组细胞中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,白藜芦醇组细胞中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量显著降低 ($P<0.01$);与白藜芦醇组比较,白藜芦醇+DMOG 组细胞中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量显著升高 ($P<0.05$ 、0.01),见图 7。



与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。
 ** $P < 0.01$ vs sham operation group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图 3 各组大鼠脊髓组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量变化情况 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 3 Changes in the contents of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the spinal cord tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)



与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。
 ** $P < 0.01$ vs sham operation group; ## $P < 0.01$ vs model group.

图 4 各组大鼠脊髓组织中 iNOS、CD86、Arg-1、CD163 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 4 Protein expression of iNOS, CD86, Arg-1, and CD163 in the spinal cord tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

免疫荧光结果 (图 8) 显示, 对照组比较, 模型组细胞中 CD86 蛋白荧光水平显著升高, CD163 荧光水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 白藜芦醇组细胞中 CD86 蛋白荧光水平显著降低, CD163 蛋白荧光水平显著升高 ($P < 0.01$); 与白藜芦醇组比较, 白藜芦醇+DMOG 组 CD86 蛋白荧光水平显著升高, CD163 显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

2.5 白藜芦醇通过调节 HIF-1 α /PKM2 对 LPS 诱导的 BV2 细胞糖酵解的影响

蛋白质印迹检测结果显示, 与对照组比较, 模型组细胞中 HIF-1 α 、PKM2、GLUT3、HK-1、LDHA

蛋白表达量显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 白藜芦醇组细胞中 HIF-1 α 、PKM2、GLUT3、HK-1、LDHA 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.01$); 与白藜芦醇组比较, 白藜芦醇+DMOG 组细胞中 HIF-1 α 、PKM2、GLUT3、HK-1、LDHA 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见图 9。

3 讨论

继发性脊髓损伤作为原发损伤后数秒至数月内发展的动态病理进程, 已成为神经修复干预的关键窗口期。研究表明, 神经炎症在此过程中发挥核心调控作用: 原发损伤触发坏死区大量炎症细胞浸

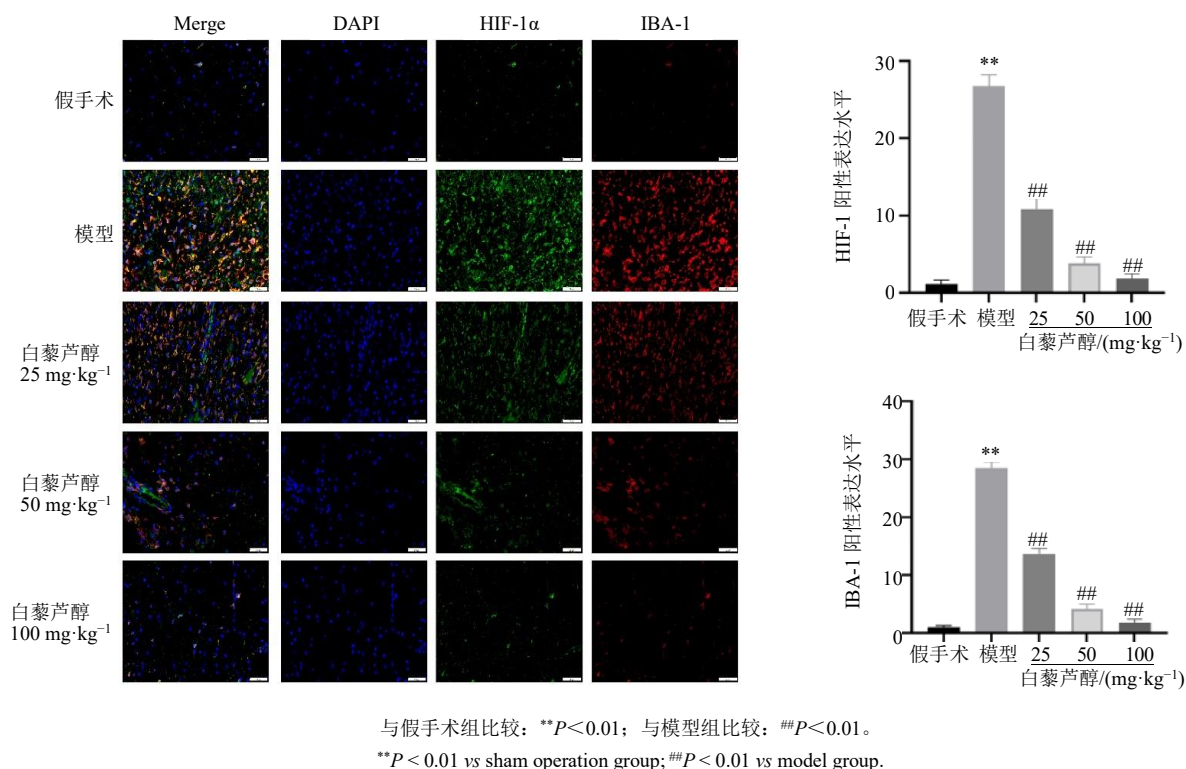


图 5 各组大鼠脊髓组织中小胶质细胞 HIF-1α 和 IBA-1 阳性表达情况 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$, $\times 200$)

Fig. 5 Positive expression of HIF-1α and IBA-1 in microglia in the spinal cord tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$, $\times 200$)

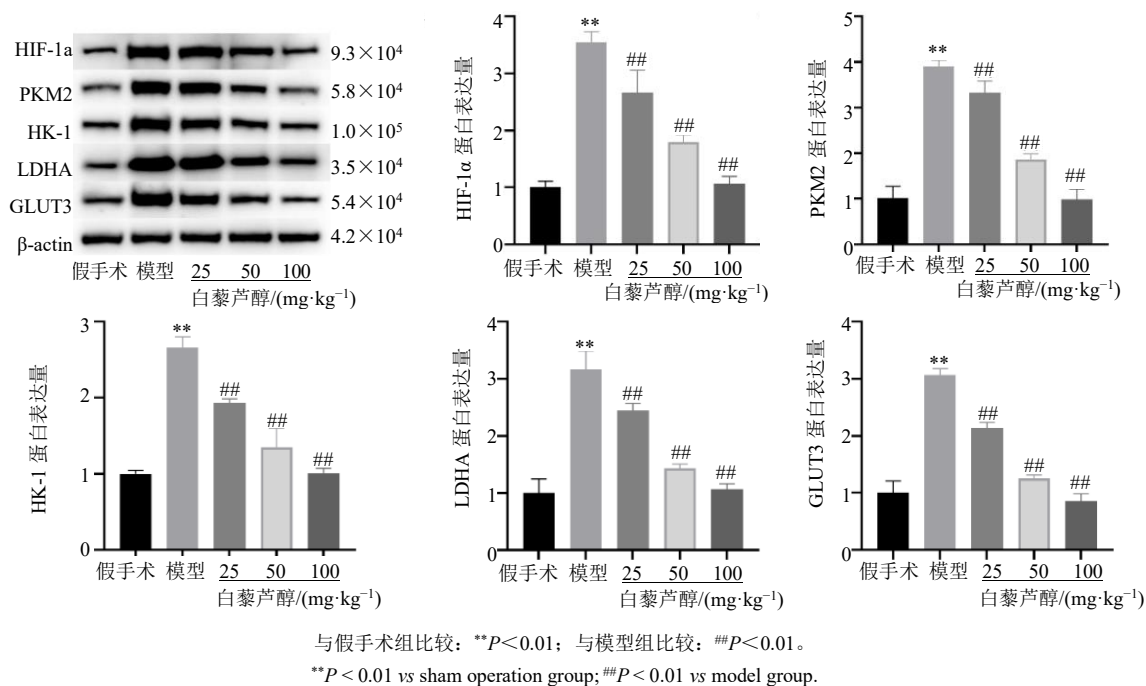
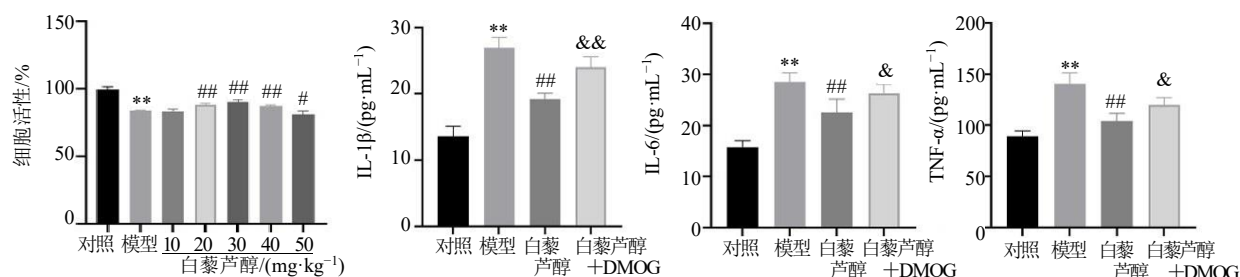


图 6 各组大鼠脊髓组织中 HIF-1α、PKM2、GLUT3、HK-1、LDHA 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 6 Protein expression of HIF-1α, PKM2, GLUT3, HK-1, and LDHA in the spinal cord tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

润, 形成抑制轴突再生的纤维化空腔^[24]。从神经病理学分期角度, 急性损伤期 (2~48 h) 呈现动态的

细胞应答特征: 局部小胶质细胞快速激活与外周单核吞噬细胞浸润形成时空共定位, 诱发多系统协同

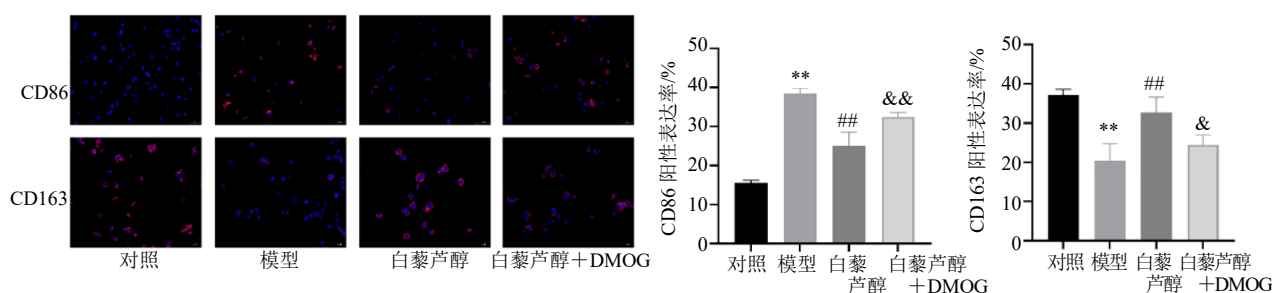


与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与白藜芦醇组比较: & $P < 0.05$ && $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; & $P < 0.05$ && $P < 0.01$ vs resveratrol group.

图 7 各组 BV2 细胞活性及细胞上清液中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量情况 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 Cell viability of BV2 in each group and the contents of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in the cell supernatant ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$; 与白藜芦醇组比较: & $P < 0.05$ && $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group; & $P < 0.05$ && $P < 0.01$ vs resveratrol group.

图 8 各组 BV2 细胞 CD86 和 CD163 荧光表达情况 ($\times 200$, $n = 3$)

Fig. 8 Fluorescence expression of CD86 and CD163 in BV2 cells of each group ($\times 200$, $n = 3$)

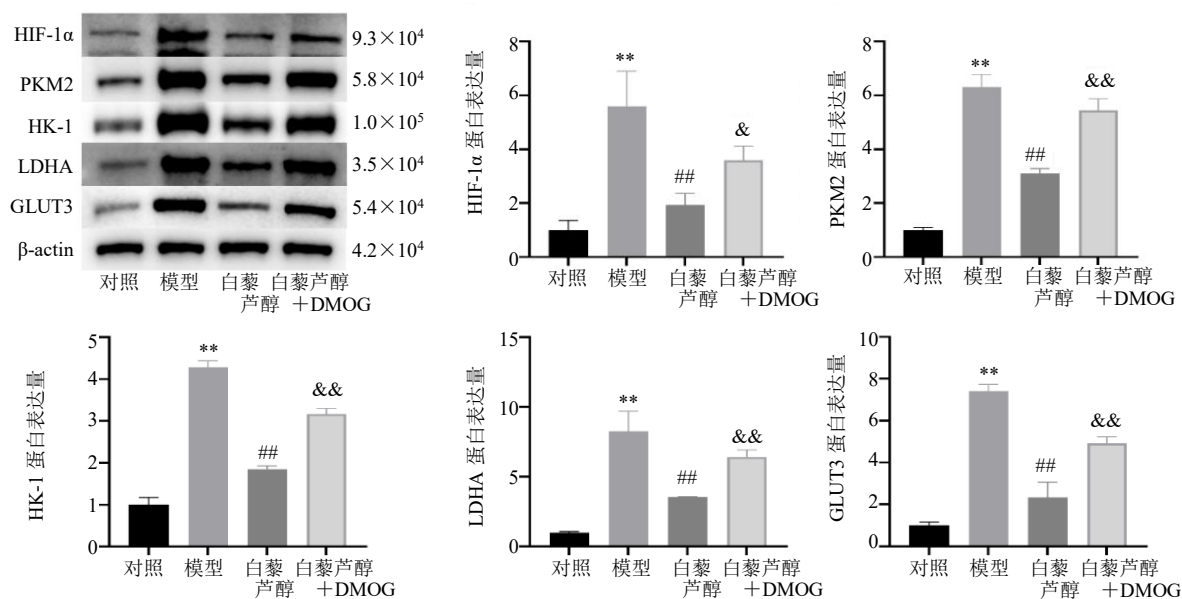


图 9 白藜芦醇通过调节 HIF-1 α /PKM2 对 LPS 诱导的 BV2 细胞糖酵解的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 9 Effect of resveratrol on glycolysis of LPS-induced BV2 cells by regulating HIF-1 α /PKM2 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

的神经免疫应答^[25]。研究证实,通过调控小胶质细胞、星形胶质细胞及浸润免疫细胞(尤其单核-巨噬

细胞系统)在急性期、亚急性期及慢性期的表型转化,可有效干预继发性损伤进程^[4]。其中小胶质细

胞作为中枢神经系统固有免疫监视者,通过 M1/M2 表型动态平衡参与炎症调控: M1 型极化由 Toll 样受体/干扰素 γ 信号驱动,高表达诱导型 iNOS、CD86 等标志物并分泌 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等促炎因子;而 M2 型极化(抗炎表型)则由 Th2 细胞因子诱导,特征性高表达 CD163、Arg1 等标志物,参与组织修复与代谢稳态维持^[26-27]。本实验使用 LPS 刺激 BV2 细胞模拟脊髓损伤后小胶质细胞出现神经炎症反应的情况。结果表明,白藜芦醇具有抑制脊髓损伤大鼠脊髓组织中小胶质细胞和 BV2 细胞 M1 极化,促进 M2 极化的效果,具体表现为 iNOS 和 CD86 蛋白表达降低,CD163 和 Arg1 表达升高,同时降低脊髓组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量,说明白藜芦醇可以通过调节小胶质细胞极化降低大鼠脊髓损伤后炎症损伤。该结果与 Kan 等^[28]报道的脊髓损伤后炎症因子动态变化规律一致,提示其通过调控小胶质细胞极化表型平衡发挥抗炎作用。

在神经免疫代谢调控领域,小胶质细胞极化过程伴随显著的代谢重编程现象。M1 型活化小胶质细胞通过上调葡萄糖转运体 1 (GLUT1) 介导的葡萄糖摄取增强及糖酵解速率加速,形成特征性的“Warburg 样代谢转换”,以满足其促炎表型的高能量需求;M2 型极化细胞主要依赖线粒体氧化磷酸化维持能量代谢稳态^[29]。值得注意的是,促炎信号可诱导小胶质细胞代谢重构,表现为糖酵解关键酶 PFK 和 LDHA 表达上调,通过磷酸三腺苷造成持续性炎症反应^[30]。丙酮酸激酶(PK)作为糖酵解终末阶段的限速酶,在中枢神经系统中呈现亚型特异性表达模式: PKM1 作为组成型异构体维持基础代谢稳态,而 PKM2 作为诱导型异构体则通过动态构象转换响应病理生理刺激。研究表明,PKM2 在促炎微环境中发生四聚体-二聚体构象失衡,其低活性二聚体形式通过主动核转运机制向核内迁移,直接结合糖酵解限速酶基因(LDHA、GLUT)及促炎因子基因簇的启动子保守区域,启动糖酵解代谢重编程与炎症级联反应的转录调控网络^[31]。在 LPS 等促炎因子刺激条件下,可显著上调 PKM2 的转录水平,同时通过磷酸化修饰促进其二聚体稳定化、抑制四聚体组装,并激活核定位信号介导的核转位过程^[31]。本研究结果表明,白藜芦醇在体内、外均展现出对 HIF-1 α /PKM2 通路以及糖酵解的抑制作用,该结果与 Wen 等^[32]发现提高 HK 和 PFK 活性有利于改善脊髓损伤小鼠后肢运动功能的结果相

似。本研究还表明,在 HIF-1 α 激动剂 DMOG 的干预下,白藜芦醇抑制 HIF-1 α /PKM2 通路的效果减弱,结合 Wang 等^[17]表明白藜芦醇和 HIF-1 α 抑制剂(PX478)均抑制 NLRP3 炎症小体、IL-1 β 、HIF-1 α 表达的研究结果,说明白藜芦醇调节小胶质细胞 M2 倾向的机制可能与抑制 HIF-1 α /PKM2 通路以及糖酵解有关。

本研究系统阐明白藜芦醇通过抑制 HIF-1 α /PKM2 介导的糖酵解代谢重编程,调控小胶质细胞 M2 型极化倾向,减轻脊髓损伤后炎症损伤的作用机制,为开发多靶点神经保护策略提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hu X, Xu W, Ren Y L, *et al.* Spinal cord injury: Molecular mechanisms and therapeutic interventions [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 245.
- [2] Li L M, Mu J F, Zhang Y, *et al.* Stimulation by exosomes from hypoxia preconditioned human umbilical vein endothelial cells facilitates mesenchymal stem cells angiogenic function for spinal cord repair [J]. *ACS Nano*, 2022, 16(7): 10811-10823.
- [3] Sun Z Z, Nyanzu M, Yang S, *et al.* VX765 attenuates pyroptosis and HMGB1/TLR4/NF- κ B pathways to improve functional outcomes in TBI mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 7879629.
- [4] Freyermuth-Trujillo X, Segura-Urbe J J, Salgado-Ceballos H, *et al.* Inflammation: A target for treatment in spinal cord injury [J]. *Cells*, 2022, 11(17): 2692.
- [5] Ge M H, Tian H, Mao L, *et al.* Zinc attenuates ferroptosis and promotes functional recovery in contusion spinal cord injury by activating Nrf2/GPX4 defense pathway [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2021, 27(9): 1023-1040.
- [6] Yang L Y, Tsai M Y, Juan S H, *et al.* Exerting the appropriate application of methylprednisolone in acute spinal cord injury based on time course transcriptomics analysis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(23): 13024.
- [7] Mcgettrick A F, O'Neill L A J. The role of HIF in immunity and inflammation [J]. *Cell Metab*, 2020, 32(4): 524-536.
- [8] Xia X M, Chen W L, Zhou T, *et al.* TEPP-46 inhibits glycolysis to promote M2 polarization of microglia after ischemic stroke [J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 149: 114148.
- [9] Ren X L, Song H, Wang Y C, *et al.* TIPE1 limits virus replication by disrupting PKM2/HIF-1 α /glycolysis feedback loop [J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 221: 52-63.
- [10] 陈诺, 易飞扬, 李振宇, 等. 白藜芦醇治疗溃疡性结肠

- 炎的药理作用和临床研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2025, 40(5): 1303-1307.
- [11] Xiang Z M, Zhang S, Yao X D, *et al.* Resveratrol promotes axonal regeneration after spinal cord injury through activating Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Aging* (Albany NY), 2021, 13(20): 23603-23619.
- [12] 张文静, 徐浩群, 李冲, 等. 白藜芦醇对脑缺血损伤的保护作用及机制研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(22): 7564-7576.
- [13] Zhu X D, Lei X P, Wang J Y, *et al.* Protective effects of resveratrol on hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats by alleviating apoptosis and ROS production [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2020, 33(24): 4150-4158.
- [14] Tang S, Botchway B O A, Zhang Y, *et al.* Resveratrol can improve spinal cord injury by activating Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Ann Anat*, 2024, 251: 152180.
- [15] Ni C T, Ye Q, Mi X D, *et al.* Resveratrol inhibits ferroptosis via activating NRF2/GPX4 pathway in mice with spinal cord injury [J]. *Microsc Res Tech*, 2023, 86(10): 1378-1390.
- [16] Li D C, Liu S Y, Lu X, *et al.* The circadian clock gene bmal1 regulates microglial pyroptosis after spinal cord injury via NF- κ B/MMP9 [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(12): e70130.
- [17] Wang Y M, Li W, Zhang T H, *et al.* Resveratrol alleviates MSU-induced gouty arthritis in rats through inhibition of HIF-1 α - and NLRP3-derived IL-1 β secretion in macrophages [J]. *Cell Mol Biol* (Noisy-le-grand), 2023, 69(7): 28-34.
- [18] Jiang T T, Ji C L, Yu L J, *et al.* Resveratrol-induced SIRT1 activation inhibits glycolysis-fueled angiogenesis under rheumatoid arthritis conditions independent of HIF-1 α [J]. *Inflamm Res*, 2023, 72(5): 1021-1035.
- [19] 徐纪伟, 孙丹华, 王宁, 等. 参枝苓促进大鼠脊髓损伤后神经功能恢复及机制 [J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(15): 3787-3793.
- [20] Zhu S P, Ying Y B, Ye J H, *et al.* AAV2-mediated and hypoxia response element-directed expression of bFGF in neural stem cells showed therapeutic effects on spinal cord injury in rats [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(3): 274.
- [21] Wei Y L, Jia J, Jin X, *et al.* Resveratrol ameliorates inflammatory damage and protects against osteoarthritis in a rat model of osteoarthritis [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 1493-1498.
- [22] Zhang H C, Xiang L B, Yuan H, *et al.* ARL11 knockdown alleviates spinal cord injury by inhibiting neuroinflammation and M1 activation of microglia in mice [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2025, 1871(1): 167522.
- [23] Schreiber T, Scharner B, Thévenod F. Insoluble HIFa protein aggregates by cadmium disrupt hypoxia-prolyl hydroxylase (PHD)-hypoxia inducible factor (HIFa) signaling in renal epithelial (NRK-52E) and interstitial (FAIK3-5) cells [J]. *Biometals*, 2024, 37(6): 1629-1642.
- [24] Xu A H, Yang Y, Shao Y, *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase family member 14 promotes functional recovery after spinal cord injury through regulating microglia M1/M2 polarization via STAT1/6 pathway [J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(8): 1809-1817.
- [25] Martínez-Moreno C G, Calderón-Vallejo D, Díaz-Galindo C, *et al.* Gonadotropin-releasing hormone and growth hormone act as anti-inflammatory factors improving sensory recovery in female rats with thoracic spinal cord injury [J]. *Front Neurosci*, 2023, 17: 1164044.
- [26] Gualerzi A, Lombardi M, Verderio C. Microglia-oligodendrocyte intercellular communication: Role of extracellular vesicle lipids in functional signalling [J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(6): 1194-1195.
- [27] Zou Z H, Liu R X, Wang Y W, *et al.* Protein arginine methyltransferase 8 regulates ferroptosis and macrophage polarization in spinal cord injury via glial cell-derived neurotrophic factor [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2023, 29(8): 2145-2161.
- [28] Kan S L, Liu C J, Zhao X Y, *et al.* Author Correction: Resveratrol improves the prognosis of rats after spinal cord injury by inhibiting mitogen-activated protein kinases signaling pathway [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 22675.
- [29] Cheng J J, Zhang R, Xu Z R, *et al.* Early glycolytic reprogramming controls microglial inflammatory activation [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 129.
- [30] Takeda H, Yamaguchi T, Yano H, *et al.* Microglial metabolic disturbances and neuroinflammation in cerebral infarction [J]. *J Pharmacol Sci*, 2021, 145(1): 130-139.
- [31] Romero-Ramírez L, García-Rama C, Wu S Y, *et al.* Bile acids attenuate PKM2 pathway activation in proinflammatory microglia [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 1459.
- [32] Wen S, Zou Z R, Cheng S, *et al.* Ginsenoside Rb1 improves energy metabolism after spinal cord injury [J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(6): 1332-1338.

[责任编辑 高源]