

基于 Nrf2/NF- κ B 信号通路研究连翘苷对缺氧缺血性脑病新生大鼠神经元凋亡的影响

张艺森¹, 张 玉², 张 新¹

1. 驻马店市中心医院 新生儿科, 河南 驻马店 463000

2. 新乡市中心医院 新生儿科, 河南 新乡 453000

摘要: 目的 研究连翘苷对新生大鼠缺氧缺血性脑病 (hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE) 神经元凋亡的影响及其作用机制。方法 采用 Rice-Vannucci 法构建新生大鼠 HIE 模型, 并将造模成功的 72 只新生大鼠随机分为模型组及连翘苷低、高剂量 (25、50 mg/kg) 组和连翘苷 (50 mg/kg) + 核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 抑制剂 brusatol (0.4 mg/kg) 组, 另选取 18 只新生大鼠作为假手术组。连续给药 20 d, 末次干预 12 h 后, 通过神经学评分评估大鼠神经行为学功能变化情况; 苏木素-伊红 (HE) 染色检测大鼠缺血侧海马组织病理损伤; TUNEL 染色检测缺血侧海马神经元凋亡情况; ELISA 法检测缺血侧海马组织炎症因子白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平; 比色法检测缺血侧海马组织氧化应激指标超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平; Western blotting 检测缺血侧海马组织 Nrf2/核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路相关蛋白表达; 免疫荧光检测缺血侧海马组织 Nrf2 与 NF- κ B 的共定位情况。结果 与假手术组比较, 模型组新生大鼠神经功能评分、神经元凋亡率及海马组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MDA 水平和细胞核 NF- κ B p65 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 海马组织 SOD、CAT 活性及细胞核 Nrf2、细胞质 NF- κ B 抑制蛋白 α (inhibitor α of NF- κ B, I κ B α)、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), Nrf2 和 NF- κ B 共定位荧光强度降低; 与模型组比较, 连翘苷各剂量组神经功能评分、神经元凋亡率及海马组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MDA 水平和细胞核 NF- κ B p65 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 海马组织 SOD、CAT 活性及细胞核 Nrf2、细胞质 I κ B α 、HO-1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), Nrf2 和 NF- κ B 共定位荧光强度升高; Nrf2 抑制剂可显著减弱连翘苷的上述作用 ($P < 0.05$)。结论 连翘苷可降低炎症反应和氧化应激, 抑制神经元凋亡, 减轻新生大鼠 HIE 的神经损伤, 其作用机制可能与促进 Nrf2 的核内转移、抑制 NF- κ B 通路有关。

关键词: 连翘苷; 缺氧缺血性脑病; 神经元凋亡; 炎症反应; 氧化应激; 核因子 E2 相关因子 2; 核因子- κ B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)10-3577-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.10.016

Effect of phillyrin on neuronal apoptosis in neonatal rats with hypoxic-ischemic encephalopathy based on Nrf2/NF- κ B signaling pathway

ZHANG Yisen¹, ZHANG Yu², ZHANG Xin¹

1. Department of Neonatology, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian 463000, China

2. Department of Neonatology, Xinxiang Central Hospital, Xinxiang 453000, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of phillyrin on neuronal apoptosis in neonatal rats with hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE). **Methods** Rice Vannucci method was used to construct a neonatal rat model of HIE, and 72 successfully modeled neonatal rats were stochastically separated into model group, phillyrin low-, high-dose (25, 50 mg/kg) groups and phillyrin (50 mg/kg) + nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) inhibitor brusatol (0.4 mg/kg) group. Another 18 newborn rats were regarded as sham group. Drugs were continuously given for 20 d, after 12 h of the last intervention, neurological scores were applied to evaluate changes in neurobehavioral function of rats; Hematoxylin-eosin (HE) staining was applied to detect pathological damage in ischemic hippocampus of rats; TUNEL staining was used to measure apoptosis of hippocampal neurons on ischemic side;

收稿日期: 2024-11-12

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目 (SB201904015)

作者简介: 张艺森, 硕士, 副主任医师, 从事新生儿神经研究。E-mail: zahng8888@126.com

ELISA method was used to detect the levels of inflammatory factors interleukin-6 (IL-6), IL-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in ischemic hippocampal tissue; Colorimetric method was applied to detect the oxidative stress indicators of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) activities and malondialdehyde (MDA) level in ischemic hippocampal tissue; Western blotting was applied to detect the expressions of Nrf2/nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway related proteins in ischemic hippocampus of rats; Co-localization of Nrf2 and NF- κ B in ischemic hippocampal tissue was detected by immunofluorescence. **Results** Compared with sham group, the neurological function score, neuronal apoptosis rate, levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α and MDA, and nuclear NF- κ B p65 protein expression level in hippocampal tissue of neonatal rats in model group were significantly increased ($P < 0.05$), activities of SOD, CAT and nuclear Nrf2, inhibitor α of NF- κ B (I κ B α) and heme oxygenase-1 (HO-1) protein expression levels in hippocampal tissue were significantly decreased ($P < 0.05$), the fluorescence intensity of Nrf2 and NF- κ B colocalization was decreased; Compared with model group, the neurological function score, neuronal apoptosis rate, levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α and MDA, and nuclear NF- κ B p65 protein expression level in hippocampal tissue in phillyrin groups were significantly decreased ($P < 0.05$), activities of SOD, CAT and nuclear Nrf2, I κ B α and HO-1 protein expression levels in hippocampal tissue were significantly increased ($P < 0.05$), the fluorescence intensity of Nrf2 and NF- κ B colocalization was increased; Nrf2 inhibitor was able to attenuate the aforementioned effects of phillyrin. **Conclusion** Phillyrin could reduce inflammation and oxidative stress, inhibit neuronal apoptosis, and alleviate nerve damage in neonatal rats with HIE. Its mechanism may be related to promoting nuclear metastasis of Nrf2 and inhibiting NF- κ B pathway.

Key words: phillyrin; hypoxic-ischemic encephalopathy; neuronal apoptosis; inflammatory response; oxidative stress; nuclear factor erythroid 2-related factor 2; nuclear factor- κ B

新生儿缺氧缺血性脑病 (hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE) 是指在围产期窒息而导致脑的缺氧缺血性损害, 是新生儿期后病残儿中最常见的病因之一, 严重威胁着新生儿的生命^[1-2]。低温治疗是唯一被临床认可的治疗方法, 但轻度低温治疗的窗口期较短, 且严重 HIE 患者的治疗效果和神经修复能力有限^[3]。因此, 迫切需要发现一种安全有效的治疗方法。

神经元凋亡是导致 HIE 患儿出现神经系统后遗症的重要原因之一^[4]。炎症和氧化应激是新生儿 HIE 的 2 种主要病理生理机制, 在 HIE 发病机制和进展中发挥重要作用^[5]。据报道, 在 HIE 中, 炎症反应和氧化应激会加剧脑组织的损伤, 促进神经元凋亡^[6-7]。核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是一类广泛存在于真核细胞中的核转录因子, 在脑缺血缺氧损伤发生后, NF- κ B 被激活, 持续活化后的 NF- κ B 可促进促炎因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的表达, 并加剧神经元凋亡^[8]。核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 是一种内源性氧化还原敏感转录因子, 通过调控炎症和氧化应激参与抗氧化防御系统。研究显示, 药物可通过激活 Nrf2 抑制 NF- κ B 的活化, 降低新生大鼠缺氧缺血性脑损伤引起的神经炎症和氧化应激水平, 减轻神经元凋亡, 改善学习和认知功能损伤^[9-10]。连翘苷是连翘 *Forsythiae Fructus* 的重要活性成分, 具有抗炎、抗氧化、抗病

毒等多种生理功能。研究发现, 连翘苷可通过抑制缺氧/缺血诱导的神经元凋亡发挥神经保护作用^[11-12]。此外, 有报道显示, 连翘苷通过激活 Nrf2 信号通路, 发挥对脑出血小鼠的神经保护作用^[13]。然而, 连翘苷对新生儿 HIE 神经元凋亡的影响尚不清楚。因此, 本研究通过建立新生大鼠缺氧缺血模型, 探讨连翘苷在新生儿 HIE 中的作用, 并阐明 Nrf2/NF- κ B 通路是否介导该过程。

1 材料

1.1 动物

90 只 SPF 级 7 日龄新生 SD 雄性大鼠, 体质量 (14 $\pm$ 2) g, 购自北京维通达生物技术有限公司, 生产许可证号 SCXK (京) 2023-0014。饲养环境温度、湿度适宜, 光照/黑暗周期为 12 h, 食物和水自由供应。动物实验经驻马店市中心医院动物使用伦理委员会审核批准 (批准号 2022-05003)。

1.2 药品与试剂

连翘苷 (质量分数 $\geq$ 98%, 批号 DL0048) 购自成都德思特生物技术有限公司; Nrf2 抑制剂 brusatol (质量分数为 99.89%, 批号 HY-19543) 购自美国 MCE 公司; 苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (批号 G1120)、TUNEL 细胞凋亡试剂盒 (批号 T2196)、高效 RIPA 裂解液 (批号 R0010)、核蛋白提取试剂盒 (批号 EX2180)、10% SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (批号 P1203) 购自北京索莱宝科技有限公司; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 测定试剂盒 (批号 A003-1-2)、超氧化物歧化酶 (superoxide

dismutase, SOD) 测定试剂盒 (批号 A001-1-2)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 测定试剂盒 (批号 A007-1-1) 购自南京建成生物工程研究所有限公司; 大鼠 IL-1 β (批号 ml003057)、IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 ml102828)、TNF- α ELISA 试剂盒 (批号 ml002859) 购自上海酶联生物科技有限公司; NF- κ B p65 兔抗 (批号 ab32536)、NF- κ B 抑制蛋白 α (inhibitor α of NF- κ B, I κ B α) 兔抗 (批号 ab32518)、 β -actin 兔抗 (批号 ab8227)、Nrf2 兔抗 (批号 ab313825)、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 兔抗 (批号 ab189491)、Histone H3 兔抗 (批号 ab1791)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 ab6721)、Cy5 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 ab6564) 均购自英国 Abcam 公司。

1.3 仪器

Synergy LX 型多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司); CX43 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司); JY300E 型电泳仪 (北京君意东方电泳设备有限公司)。

2 方法

2.1 新生大鼠 HIE 模型的建立、分组与给药

随机选取 18 只新生大鼠作为假手术组, 其余大鼠采用改良的 Rice-Vannucci 法构建新生大鼠 HIE 模型^[14]。新生大鼠用异氟醚麻醉后, 分离左侧颈总动脉, 5 min 内结扎并切断。术后恢复 2 h 后, 将新生大鼠放入由 92% N₂ 和 8% O₂ 组成的潮湿混合气室中, 并以 3 L/min 的体积流量通风 2 h。缺氧结束后, 将所有新生大鼠放回笼子正常饲养。当观察到新生大鼠苏醒后右转圈和右前肢屈曲表明造模成功^[15]。假手术组未结扎颈总动脉, 无缺氧, 其余操作同模型大鼠。

将造模成功的 72 只新生大鼠随机分为模型组及连翘苷低、高剂量 (25、50 mg/kg)^[11]组和连翘苷 (50 mg/kg) + Nrf2 抑制剂 (0.4 mg/kg)^[16]组。连翘苷低、高剂量组在缺氧后立即 ig 连翘苷; 连翘苷 + Nrf2 抑制剂组 ig 连翘苷, 同时 ip brusatol; 假手术组和模型组大鼠同时 ig 和 ip 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续给药 20 d。

2.2 神经功能评分

末次给药 12 h 后, 采用 Zea Longa 评分法^[15]评估大鼠神经行为学功能变化情况。评分标准: 0 分, 无神经损伤; 1 分, 提尾时对侧前肢内收屈曲 (轻度神经损伤); 2 分, 行走时向对侧旋转 (中度神经

损伤); 3 分, 站立或爬行时向对侧倾倒 (重度神经损伤); 4 分, 无自主活动伴意识障碍。

2.3 HE 染色观察缺血侧海马组织病理损伤

神经功能评分结束后, 每组随机选取 6 只大鼠, 处死后取出脑组织, 用 4% 多聚甲醛固定 24 h, 并包埋在石蜡中。将脑组织切成 4 μ m 厚的切片, 进行 HE 染色, 使用光学显微镜观察缺血侧海马组织病理损伤情况并获取图像。

2.4 TUNEL 染色检测缺血侧海马神经元凋亡

取脑组织石蜡切片, 经脱蜡、水化后, 滴加蛋白酶 K 于室温孵育 30 min, 洗涤后, 滴加过氧化氢溶液于室温孵育 10 min, 将切片与 TUNEL 反应溶液孵育 1 h, 再滴加 DAPI 染核。用荧光显微镜观察 TUNEL 染色阳性的细胞, 评估缺血侧海马神经元凋亡情况。在每个切片中随机选取 3 个视野, 对凋亡神经元进行拍照。用 Image-Pro Plus 6.0 软件计数凋亡细胞, 并计算细胞凋亡率。

细胞凋亡率 = TUNEL 阳性细胞数 / DAPI 细胞数

2.5 ELISA 法检测缺血侧海马组织炎症因子水平

每组随机选取 6 只大鼠, 处死后取出缺血侧海马组织, 用 PBS 清洗后, 按 1 : 9 的比例加入 PBS, 冰上匀浆。将匀浆液于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平。

2.6 比色法检测缺血侧海马组织氧化应激相关指标水平

取“2.5”项下缺血侧脑海马组织匀浆上清液, 按照试剂盒说明书检测 MDA 水平和 SOD、CAT 活性。

2.7 Western blotting 检测缺血侧海马组织 Nrf2/NF- κ B 通路相关蛋白表达

取各组缺血侧海马组织, 加入裂解液提取总蛋白, 蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂牛奶, 室温封闭 1 h; 分别加入 NF- κ B p65 (1 : 1 000)、I κ B α (1 : 1 000)、 β -actin (1 : 1 000)、Nrf2 (1 : 1 000)、HO-1 (1 : 500) 和 Histone H3 (1 : 1 000) 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗, 室温孵育 1 h, 加入 ECL 发光液, 使用凝胶成像系统曝光, Image J 软件进行定量分析。

2.8 免疫荧光检测缺血侧海马组织 Nrf2 与 NF- κ B 的共定位情况

取各组缺血侧海马组织切片, 抗原修复后, 封闭 2 h, 滴加兔抗 Nrf2 (1 : 500)、NF- κ B 一抗 (1 :

100), 4 ℃ 孵育过夜; 滴加山羊抗兔 IgG 二抗 (1 : 1 000), 室温避光孵育 2 h, 滴加 DAPI 染色, 漂洗, 封片。采用荧光显微镜观察图像, Image Pro Plus 6.0 分析图像, 记录阳性染色细胞数。

2.9 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 所有数据均经过正态性检验和方差齐性检验, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同组间的多重比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 和 Tukey 事后检验。

3 结果

3.1 各组新生大鼠神经功能评分比较

如表 1 所示, 与假手术组比较, 模型组新生大鼠神经功能评分明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 连翘苷低、高剂量组新生大鼠神经功能评分明显降低 ($P < 0.05$); 与连翘苷高剂量组比较, 连翘苷 + Nrf2 抑制剂组新生大鼠神经功能评分明显升高 ($P < 0.05$)。

3.2 各组新生大鼠缺血侧海马组织病理损伤比较

如图 1 和表 2 所示, 假手术组海马组织神经元

排列有序, 形态正常; 模型组海马组织神经元排列紊乱, 并有大量缺失, 神经元萎缩, 神经元数量较假手术组显著减少 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 连翘苷低、高剂量组海马组织病理损伤减轻, 神经元排列较有序, 神经元数量显著增多 ($P < 0.05$); 与连翘苷高剂量组比较, 连翘苷 + Nrf2 抑制剂组海马组织病理损伤加重, 神经元排列松散, 神经元数量显著减少 ($P < 0.05$)。

表 1 各组新生大鼠神经功能评分比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Comparison of neural function scores of newborn rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	神经功能评分
假手术	—	0.00 ± 0.00
模型	—	2.82 ± 0.25 [#]
连翘苷	25	2.13 ± 0.21 [*]
	50	1.44 ± 0.18 [*]
连翘苷 + Nrf2 抑制剂	50 + 0.4	2.50 ± 0.23 [▲]

与假手术组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与连翘苷高剂量组比较: [▲] $P < 0.05$, 下表同。
[#] $P < 0.05$ vs sham group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs phillyrin high-dose group, same as below tables.

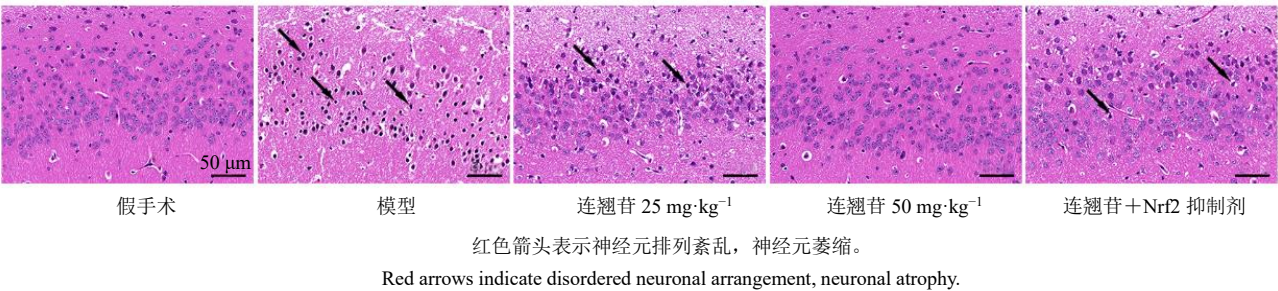


图 1 各组新生大鼠缺血侧海马组织病理学变化 (HE, ×200)
Fig. 1 Histopathological changes in ischemic hippocampus of newborn rats in each group (HE, × 200)

表 2 各组新生大鼠缺血侧海马神经元数量和凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Comparison of number and apoptosis rate of hippocampal neurons on ischemic side of newborn rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	海马神经元数量/个	神经元凋亡率/%
假手术	—	113.17 ± 11.02	2.15 ± 0.40
模型	—	42.67 ± 5.68 [#]	26.73 ± 1.22 [#]
连翘苷	25	69.17 ± 8.82 [*]	18.44 ± 1.09 [*]
	50	104.33 ± 10.86 [*]	9.60 ± 0.85 [*]
连翘苷 + Nrf2 抑制剂	50 + 0.4	59.17 ± 6.11 [▲]	21.38 ± 1.14 [▲]

3.3 各组新生大鼠缺血侧海马神经元凋亡比较

如图 2 和表 2 所示, 与假手术组比较, 模型组新生大鼠神经元凋亡率显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 连翘苷低、高剂量组神经元凋亡率显著降低 ($P < 0.05$); 与连翘苷高剂量组比较, 连翘苷 + Nrf2 抑制剂组神经元凋亡率显著升高 ($P < 0.05$)。

3.4 各组新生大鼠缺血侧海马组织 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平比较

如表 3 所示, 与假手术组比较, 模型组海马组织 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 连翘苷低、高剂量组 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与连翘苷高剂量

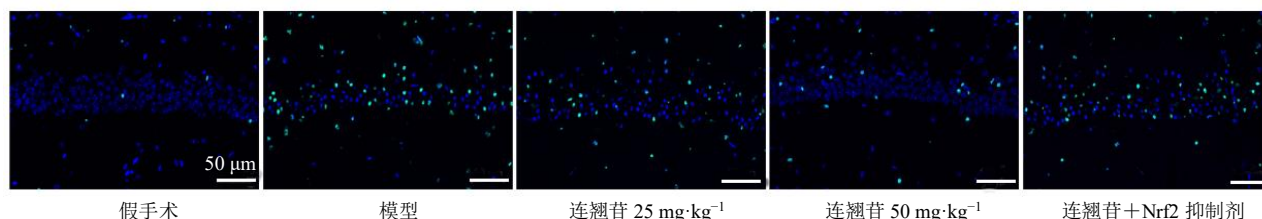


图 2 各组新生大鼠缺血侧海马神经元凋亡情况 (TUNEL, ×200)

Fig. 2 Apoptosis of hippocampal neurons on ischemic side of newborn rats in each group (TUNEL, × 200)

表 3 各组新生大鼠缺血侧海马组织 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Comparison of IL-1β, IL-6 and TNF-α levels in ischemic hippocampal tissue of newborn rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-1β/(pg·mg ⁻¹)	IL-6/(pg·mg ⁻¹)	TNF-α/(pg·mg ⁻¹)
假手术	—	10.28 ± 1.73	32.50 ± 5.18	21.79 ± 3.42
模型	—	63.54 ± 3.09 [#]	147.26 ± 9.17 [#]	88.35 ± 6.16 [#]
连翘苷	25	47.36 ± 2.82 [*]	99.43 ± 8.04 [*]	64.20 ± 5.59 [*]
	50	26.80 ± 2.17 [*]	50.71 ± 6.35 [*]	39.65 ± 4.80 [*]
连翘苷+Nrf2 抑制剂	50+0.4	53.25 ± 2.94 [▲]	123.09 ± 8.86 [▲]	74.11 ± 5.73 [▲]

组比较,连翘苷+Nrf2 抑制剂组 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平显著升高 ($P < 0.05$)。

3.5 各组新生大鼠缺血侧海马组织 MDA 水平和 SOD、CAT 活性比较

如表 4 所示,与假手术组比较,模型组大鼠海

马组织 MDA 水平显著升高 ($P < 0.05$),SOD 和 CAT 活性显著降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,连翘苷低、高剂量组海马组织 MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$),SOD 和 CAT 活性显著升高 ($P < 0.05$);与连翘苷高剂量组比较,连翘苷+Nrf2 抑制剂组 MDA

表 4 各组新生大鼠缺血侧海马组织 MDA 水平和 SOD、CAT 活性比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Comparison of MDA level and SOD, CAT activities in hippocampus of ischemic neonatal rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	CAT/(U·mg ⁻¹)
假手术	—	42.50 ± 6.12	187.49 ± 15.30	255.63 ± 28.17
模型	—	133.79 ± 10.45 [#]	66.30 ± 9.22 [#]	104.21 ± 16.94 [#]
连翘苷	25	101.63 ± 9.38 [*]	98.85 ± 10.37 [*]	151.49 ± 19.35 [*]
	50	67.15 ± 7.27 [*]	140.36 ± 12.50 [*]	208.72 ± 23.62 [*]
连翘苷+Nrf2 抑制剂	50+0.4	114.80 ± 9.92 [▲]	79.02 ± 8.46 [▲]	136.18 ± 20.05 [▲]

水平显著升高 ($P < 0.05$),SOD 和 CAT 活性显著降低 ($P < 0.05$)。

3.6 各组新生大鼠缺血侧海马组织 Nrf2/NF-κB 通路相关蛋白表达比较

如图 3 和表 5 所示,与假手术组比较,模型组大鼠海马组织细胞核 NF-κB p65 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$),细胞核 Nrf2 和细胞质 IκBα、HO-1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,连翘苷低、高剂量组海马组织细胞核 NF-κB p65 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$),细胞核 Nrf2 和细胞质 IκBα、HO-1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$);与连翘苷高剂量组比较,连翘苷+Nrf2 抑制剂组海马组织细胞核 NF-κB p65 蛋白表达水平显著

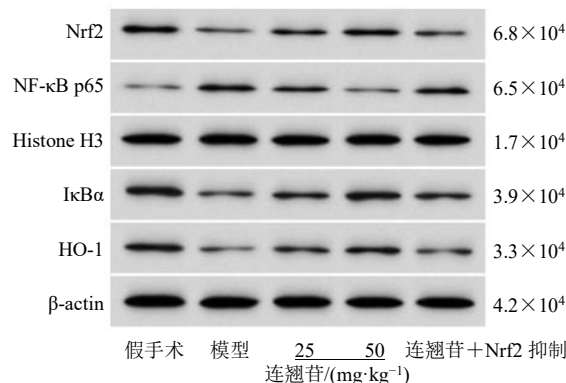


图 3 各组新生大鼠缺血侧海马组织 Nrf2/NF-κB 通路相关蛋白表达

Fig. 3 Nrf2/NF-κB pathway related protein expressions in ischemic hippocampal tissue of newborn rats in each group

表 5 各组新生大鼠缺血侧海马组织 Nrf2/NF-κB 通路相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Comparison of Nrf2/NF-κB pathway related protein expressions in ischemic hippocampal tissue of newborn rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Nrf2/Histone H3	NF-κB p65/Histone H3	IκBα/β-actin	HO-1/β-actin
假手术	—	0.63 ± 0.08	0.16 ± 0.03	0.85 ± 0.07	0.57 ± 0.05
模型	—	0.21 ± 0.04 [#]	0.48 ± 0.06 [#]	0.33 ± 0.04 [#]	0.16 ± 0.03 [#]
连翘苷	25	0.35 ± 0.05 [*]	0.36 ± 0.04 [*]	0.49 ± 0.05 [*]	0.30 ± 0.04 [*]
	50	0.49 ± 0.07 [*]	0.24 ± 0.03 [*]	0.70 ± 0.08 [*]	0.45 ± 0.06 [*]
连翘苷+Nrf2 抑制剂	50+0.4	0.28 ± 0.04 [▲]	0.40 ± 0.05 [▲]	0.42 ± 0.06 [▲]	0.24 ± 0.04 [▲]

升高 ($P < 0.05$), 细胞核 Nrf2 和细胞质 IκBα、HO-1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

3.7 各组大鼠缺血侧海马组织 Nrf2、NF-κB 免疫荧光共定位情况比较

如图 4 所示, 与假手术组比较, 模型组海马组

织中 Nrf2 和 NF-κB 共定位荧光强度减弱; 与模型组比较, 连翘苷低、高剂量组海马组织 Nrf2 和 NF-κB 共定位荧光强度增强; 与连翘苷高剂量组比较, 连翘苷+Nrf2 抑制剂组海马组织 Nrf2 和 NF-κB 共定位荧光强度减弱。

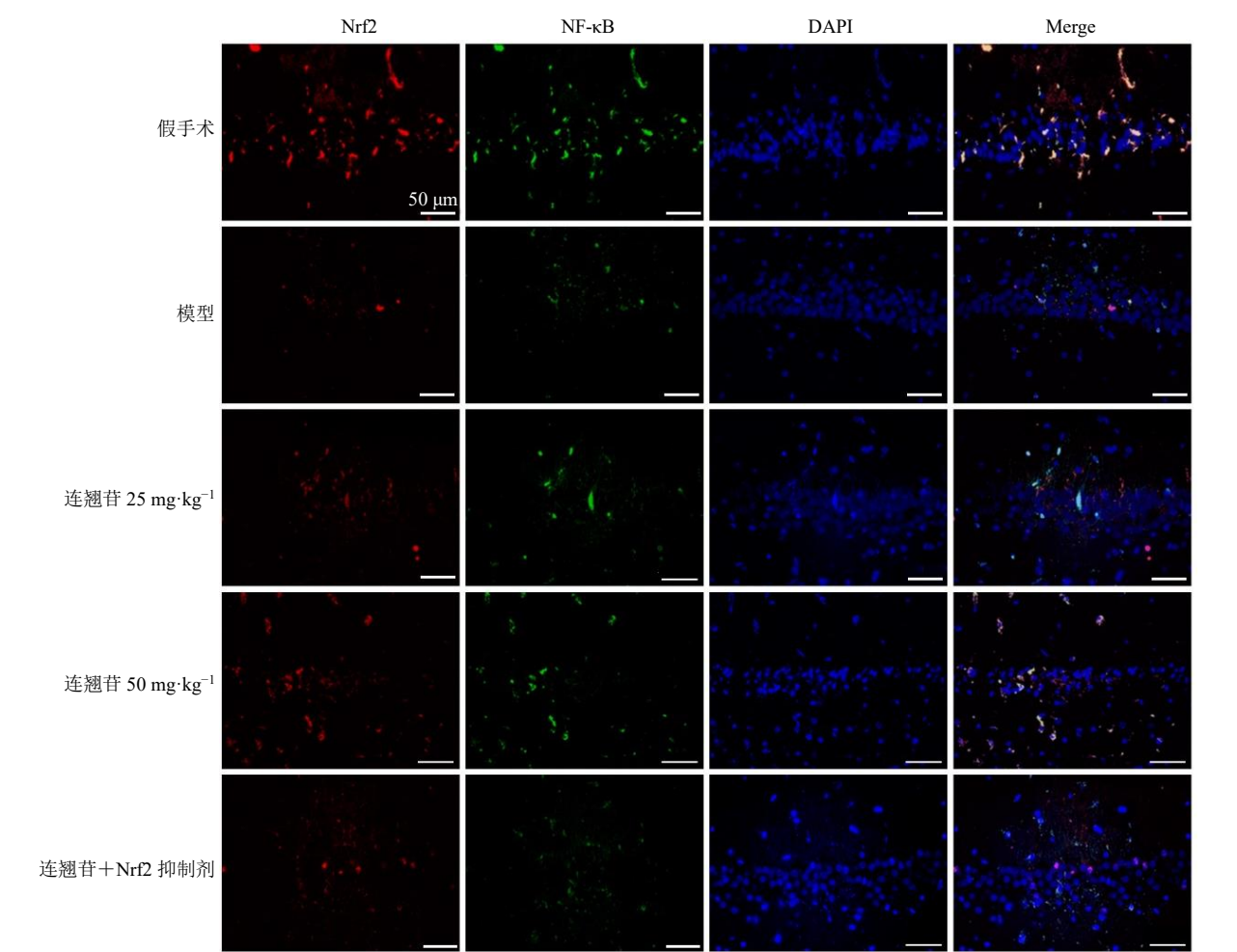


图 4 大鼠缺血侧海马组织 Nrf2 和 NF-κB 免疫荧光共定位图 (×200)

Fig. 4 Immunofluorescence colocalization of Nrf2 and NF-κB in ischemic hippocampal tissue of rats (×200)

4 讨论

缺氧缺血会导致新生儿脑病和脑损伤, 并进一步导致脑瘫、认知障碍、生长受限和癫痫。在 HIE 的发病过程中, 缺氧和缺血会导致神经元发生凋亡^[17]。

因此, 预防和治疗神经元凋亡对于改善 HIE 患儿的预后具有重要意义。

炎症和氧化应激是 HIE 治疗中的关键因素, 在 HIE 中, 由于脑组织的能量供应不足, 氧化代谢过

程受到抑制,导致大量自由基(如超氧阴离子、羟自由基等)产生,破坏细胞结构和功能,促进神经元死亡和凋亡,进而加剧脑组织损伤^[18]。此外,氧化应激可以激活炎症反应,引起炎症细胞的浸润和炎症介质的释放;炎症介质(如 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等)可直接或间接作用于神经元,激活神经元内的凋亡信号转导途径,促进神经元凋亡^[19-20]。据报道,新生儿 HIE 血清中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 水平均升高,药物可通过降低新生儿 HIE 血清中促炎因子的水平,减轻神经损伤,改善神经行为^[21]。近年来,多项研究证实从植物中提取的天然化合物(如绿原酸^[9]、染料木黄酮^[10]、人参皂苷 Rg₁^[20])具有对抗 HIE 的神经保护作用。这些天然药物具有抗炎、抗氧化、抗凋亡和神经功能调节特性,对实验性新生儿 HIE 具有预防或治疗作用。连翘苷是从连翘中提取的一种化合物,具有显著的抗炎和抗氧化作用。研究显示,在流感病毒肺炎大鼠模型中,连翘苷可降低大鼠肺组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平,减少炎症细胞的浸润,减轻肺损伤^[22];在脑缺血再灌注大鼠模型和 H₂O₂ 处理大鼠原代皮层神经元诱导建立的氧化应激损伤模型中,连翘苷可通过抑制氧化应激和神经元细胞凋亡来减轻脑损伤^[11-12]。在本研究中,新生大鼠 HIE 模型脑组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 MDA 水平均升高,SOD 和 CAT 活性降低,神经元凋亡率升高,与既往的研究结果一致,再次证实新生大鼠 HIE 模型存在明显的炎症和氧化应激。给予连翘苷干预后,新生大鼠 HIE 模型脑组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 MDA 水平降低,SOD 和 CAT 活性升高,神经元凋亡率降低,提示连翘苷可降低多种炎症因子的表达,增强抗氧化酶活性,减轻炎症反应和氧化应激,抑制神经元凋亡,表明连翘苷能通过减轻氧化应激调控炎症细胞的浸润和炎症介质的释放,抑制神经元内的凋亡信号转导途径,抑制神经元凋亡,从而减轻新生大鼠 HIE 的神经损伤^[18-20]。

NF- κ B 是一种多效性转录因子,几乎存在于所有细胞类型中,在静态细胞中,NF- κ B 与其抑制蛋白 I κ B α 结合形成复合物,存在于细胞质中,以防止其进入细胞核;当细胞遭遇来自胞内或胞外的各种刺激时,NF- κ B 信号通路被激活,NF- κ B 进入细胞核,NF- κ B 核移位可促进促炎因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的表达。研究显示,在 HIE 新生大鼠海马 CA1 区凋亡神经细胞数与 NF- κ B p65 核阳性表达细

胞数呈正相关^[23]。Nrf2 是一种关键的内源性抗氧化转录因子,通过促进各种抗氧化基因的转录来防止氧化应激;且 Nrf2 可负向调控 NF- κ B 的核移位,Nrf2 的缺失会加剧 NF- κ B 活化,导致促炎细胞因子产生增加^[24-25]。已有研究表明,一些抗氧化应激和抗炎药物可通过激活 Nrf2 信号通路对新生儿 HIE 发挥神经保护作用^[26]。HO-1 是 Nrf2 的下游分子,Guo 等^[13]发现,连翘苷可通过促进 Nrf2 核转位,上调 HO-1 的表达,激活 Nrf2 信号通路减轻脑出血损伤引起的细胞凋亡和氧化应激,保护神经元。在本研究中,连翘苷可升高新生大鼠 HIE 模型脑组织中核 Nrf2、细胞质 I κ B α 、HO-1 蛋白表达水平,降低核 NF- κ B p65 蛋白表达水平,增强 Nrf2 和 NF- κ B 相互作用;且 Nrf2 抑制剂 brusatol 可减弱连翘苷的上述作用,提示连翘苷可能通过上调 Nrf2 的核内转移,抑制 NF- κ B 通路,对新生大鼠 HIE 发挥神经保护作用。

综上,连翘苷可降低炎症反应和氧化应激,抑制神经元凋亡,减轻新生大鼠 HIE 的神经损伤,其作用机制可能与促进 Nrf2 的核内转移、抑制 NF- κ B 通路有关。本研究发现连翘苷可通过调控 Nrf2/NF- κ B 通路改善 HIE,表明连翘苷可能是治疗 HIE 脑损伤的潜在治疗策略。未来课题组将评估连翘苷对新生大鼠 HIE 后学习和认知功能的远期影响来进一步验证连翘苷的神经保护作用。此外,连翘苷对新生大鼠 HIE 后脑组织其他区域(如皮层)的影响仍需深入探讨。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ranjan A K, Gulati A. Advances in therapies to treat neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. *J Clin Med*, 2023, 12(20): 6653.
- [2] Arnautovic T, Sinha S, Laptook A R. Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy and hypothermia treatment [J]. *Obstet Gynecol*, 2024, 143(1): 67-81.
- [3] Wang Z, Zhang D, Zhang P, et al. Safety and efficacy of therapeutic hypothermia in neonates with mild hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. *BMC Pediatr*, 2023, 23(1): 530.
- [4] Rodriguez J, Li T, Xu Y R, et al. Role of apoptosis-inducing factor in perinatal hypoxic-ischemic brain injury [J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(2): 205-213.
- [5] Pedroza-García K A, Calderón-Vallejo D, Luis Quintanar J. Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: Perspectives of neuroprotective and neuroregenerative

- treatments [J]. *Neuropediatrics*, 2022, 53(6): 402-417.
- [6] Cheng S, Chen C, Wang L L. Gelsemine exerts neuroprotective effects on neonatal mice with hypoxic-ischemic brain injury by suppressing inflammation and oxidative stress via Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Neurochem Res*, 2023, 48(5): 1305-1319.
- [7] Yang Y P, Li Y, Yang W Y, *et al.* Protecting effects of 4-octyl itaconate on neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy via Nrf2 pathway in astrocytes [J]. *J Neuroinflammation*, 2024, 21(1): 132.
- [8] Zhao J, Yin L L, Jiang L, *et al.* PTEN nuclear translocation enhances neuronal injury after hypoxia-ischemia via modulation of the nuclear factor- κ B signaling pathway [J]. *Aging*, 2021, 13(12): 16165-16177.
- [9] Zheng Y H, Li L Y, Chen B W, *et al.* Chlorogenic acid exerts neuroprotective effect against hypoxia-ischemia brain injury in neonatal rats by activating Sirt1 to regulate the Nrf2-NF- κ B signaling pathway [J]. *Cell Commun Signal*, 2022, 20(1): 84.
- [10] Li Y, Zhang J J, Chen R J, *et al.* Genistein mitigates oxidative stress and inflammation by regulating Nrf2/HO-1 and NF- κ B signaling pathways in hypoxic-ischemic brain damage in neonatal mice [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(2): 32.
- [11] Chen S, Zhang S, Wu H G, *et al.* Protective effect of phillyrin against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats and oxidative stress-induced cell apoptosis and autophagy in neurons [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3): 7940-7950.
- [12] Wei T, Tian W L, Yan H Y, *et al.* Protective effects of phillyrin on H₂O₂-induced oxidative stress and apoptosis in PC12 cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2014, 34(8): 1165-1173.
- [13] Guo X, Cao P P, Lian X F, *et al.* The neuroprotective effect of phillyrin in intracerebral hemorrhagic mice is produced by activation of the Nrf2 signaling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 909: 174439.
- [14] Taniguchi H, Andreasson K. The hypoxic-ischemic encephalopathy model of perinatal ischemia [J]. *J Vis Exp*, 2008(21): 955.
- [15] 余恒, 宋光捷. 去甲斑蝥素通过 Nrf2 通路保护新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的机制 [J]. 西北药学杂志, 2022, 37(4): 82-86.
- [16] Fu C C, Zheng Y H, Zhu J J, *et al.* Lycopene exerts neuroprotective effects after hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats via the nuclear factor erythroid-2 related factor 2/nuclear factor- κ -gene binding pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 585898.
- [17] Tregub P, Malinovskaya N, Hilazheva E, *et al.* Permissive hypercapnia and hypercapnic hypoxia inhibit signaling pathways of neuronal apoptosis in ischemic/hypoxic rats [J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(3): 2317-2333.
- [18] Li Y, Chen L, Zheng D, *et al.* Echinocystic acid alleviated hypoxic-ischemic brain damage in neonatal mice by activating the PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1103265.
- [19] 杨红秀, 李丽华. Omega-3 多不饱和脂肪酸对缺血缺氧性脑损伤幼鼠炎症和细胞凋亡反应的影响 [J]. 临床神经外科杂志, 2023, 20(2): 173-178.
- [20] 张明晓, 方峰, 杨艳, 等. 人参皂苷 Rg₁ 对幼龄大鼠缺氧缺血性脑损伤和神经元凋亡的保护作用 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2021, 42(5): 693-699.
- [21] 曹娟, 王红怡, 霍开明, 等. 单唾液酸四己糖神经节苷脂钠联合亚低温对新生儿 HIE 血清炎症因子、神经损伤及神经行为的影响 [J]. 中国妇幼健康研究, 2021, 32(11): 1649-1653.
- [22] 刘海燕, 付明月, 孙海珍, 等. 连翘苷调节 SphK1/S1P/S1PR1 信号通路对流感病毒肺炎大鼠肺损伤的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(3): 378-382.
- [23] 李开花, 曲云霞. 缺氧缺血性脑损伤新生大鼠海马 CA1 区 NF- κ B 激活与神经元凋亡的关系 [J]. 广东医学, 2011, 32(1): 47-49.
- [24] 董军立, 贾诚谦, 姚宪宝, 等. 二甲双胍基于 Nrf2/HO-1/NF- κ B 信号通路对腰椎间盘突出退变的影响 [J]. 广西医学, 2023, 45(11): 1316-1325.
- [25] Wardyn J D, Ponsford A H, Sanderson C M. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways [J]. *Biochem Soc Trans*, 2015, 43(4): 621-626.
- [26] Liu J X, Zheng D, Chen L, *et al.* Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 as a potential therapeutic target in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. *J Integr Neurosci*, 2024, 23(5): 103.

[责任编辑 李亚楠]