

· 实验研究 ·

醒脑静注射液激活 Nrf2/NLRP3/GSDMD 信号通路抑制氧糖剥夺/再灌注损伤后神经细胞焦亡的研究



全文二维码

文海韬¹ 陈小燕¹ 安喆妮² 吴水华¹¹ 湖南省儿童医院神经外科, 长沙 410007; ² 湖南省儿童医院药学部, 长沙 410007

通信作者: 吴水华, Email: 292454021@qq.com

【摘要】 目的 探讨醒脑静注射液对缺氧缺血再灌注(oxygen and glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)损伤诱导 SH-SY5Y 细胞焦亡的保护作用及机制。**方法** 使用不同浓度醒脑静注射液预处理 SH-SY5Y 细胞, 确定醒脑静注射液给药浓度; 将 SH-SY5Y 细胞随机分为对照组、OGD/R 组、醒脑静注射液 + OGD/R 组(10 μ L/mL 醒脑静注射液)以及醒脑静注射液 + OGD/R + 核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor-E2 related factor 2, Nrf2)抑制剂组(10 μ L/mL 醒脑静注射液 + 2 μ mol/mL ML385)共 4 组, 每组实验进行 6 次($n=6$), 采用 MTT 比色法检测细胞存活率; 采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法测定细胞上清液中白介素 18(interleukin 18, IL-18)和白介素-1 β (interleukin 1 beta, IL-1 β)表达水平; 采用 Western blot 检测 GasderminD 蛋白(GSDMD-N)、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)、白介素 1 β 前体(pro-interleukin 1, pro-IL-1 β)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1(caspase-1)、Nrf2 以及凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)表达情况; 采用细胞乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒测定细胞内 LDH 表达变化情况, 采用 Hoechst/PI 染色法观察细胞凋亡情况。**结果** 与对照组比较, OGD/R 组细胞存活率[(40.16 \pm 3.39)% 比 (101.3 \pm 1.54)%]、Nrf2 表达水平[(0.47 \pm 0.09) 比 (1.00 \pm 0.00)]明显降低; IL-1 β [(46.55 \pm 9.59) pg/mL 比 (9.35 \pm 3.33) pg/mL]、IL-18[(35.39 \pm 10.63) pg/mL 比 (7.85 \pm 3.04) pg/mL]、LDH 渗出率[(0.36 \pm 0.04)% 比 (0.18 \pm 0.08)%]、GSDMD-N[(2.24 \pm 0.36) 比 (1.00 \pm 0.00)]、NLRP3[(2.15 \pm 0.23) 比 (1.00 \pm 0.00)]、pro-IL-1 β [(3.08 \pm 0.17) 比 (1.00 \pm 0.00)]、caspase-1[(2.20 \pm 0.32) 比 (1.00 \pm 0.00)]表达水平明显升高, 差异有统计学意义($P<0.001$); 与 OGD/R 组比较, 醒脑静注射液组细胞存活率[(63.69 \pm 11.28)% 比 (40.16 \pm 3.39)%]、Nrf2 表达水平[(0.89 \pm 0.11) 比 (0.47 \pm 0.09)]明显升高, LDH 渗出率[(0.25 \pm 0.07)% 比 (0.36 \pm 0.04)%]、IL-1 β [(33.30 \pm 8.60) pg/mL 比 (46.55 \pm 9.59) pg/mL]、IL-18[(21.72 \pm 7.50) pg/mL 比 (35.39 \pm 10.63) pg/mL]、GSDMD-N[(1.34 \pm 0.06) 比 (2.24 \pm 0.36)]、NLRP3[(1.25 \pm 0.18) 比 (2.15 \pm 0.23)]、pro-IL-1 β [(1.65 \pm 0.30) 比 (3.08 \pm 0.17)]、caspase-1[(1.23 \pm 0.15) 比 (2.20 \pm 0.32)]表达水平明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$); 与醒脑静组比较, 醒脑静 + Nrf2 抑制剂组 Nrf2 蛋白表达水平[(0.38 \pm 0.12) 比 (0.89 \pm 0.11)]明显降低, LDH 渗出率[(0.36 \pm 0.07)% 比 (0.25 \pm 0.07)%]、IL-1 β [(53.28 \pm 6.37) pg/mL 比 (33.30 \pm 8.60) pg/mL]、IL-18[(49.56 \pm 8.87) pg/mL 比 (21.72 \pm 7.50) pg/mL]、GSDMD-N[(1.75 \pm 0.27) 比 (1.34 \pm 0.06)]、NLRP3[(2.22 \pm 0.17) 比 (1.25 \pm 0.18)]、pro-IL-1 β [(3.54 \pm 0.50) 比 (1.65 \pm 0.30)]、caspase-1[(2.36 \pm 0.28) 比 (1.23 \pm 0.15)]蛋白表达水平明显升高, 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** Nrf2 抑制剂可逆转醒脑静注射液对 OGD/R 损伤诱导 SH-SY5Y 细胞焦亡的保护作用; 醒脑静注射液通过上调 Nrf2 蛋白表达, 抑制 OGD/R 损伤诱导的 SH-SY5Y 细胞焦亡。

【关键词】 醒脑静注射液; 焦亡; 炎症小体; 脑卒中; 核因子 E2 相关因子 2**基金项目:** 湖南省中医药科研计划项目(2020108); 湖南省卫生健康委课题(202104040560)

DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202107045-014

Xingnaojing injection suppressed neuronal pyroptosis after oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury through activating Nrf2/NLRP3/GSDMD signaling pathway

Wen Haitao¹, Chen Xiaoyan¹, An Zheni², Wu Shuihua¹

¹ Department of Neurosurgery, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China; ² Department of Pharmacy, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China

Corresponding author: Wu Shuihua, Email: 292454021@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the protective mechanism of refreshing static injection for injury of oxygen and glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) induced by SH-SY5Y cells. **Methods** SH-SY5Y cells were pretreated with Xingnaojing Injection at different concentrations to determine its dosing concentration. SH-SY5Y cells were randomized into four groups of control, OGD/R, Xingnaojing Injection + OGD/R (10 μ L/mL Xingnaojing Injection) and Xingnaojing Injection + OGD/R + nuclear factor-E2 related factor 2 (Nrf2) inhibitor (10 μ L/mL Xingnaojing Injection + 2 μ mol/mL ML385). Cell survival rate was determined by MTT colorimetry. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was utilized for measuring the levels of interleukin 18 (IL-18) and interleukin 1 beta in cell supernatant. Western blot was employed for detecting the levels of Gasdermin D protein (GSDMD-N), NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3), pro-interleukin 1, pro-IL-1 β , caspase-1, Nrf2 and apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) protein. LDH expression was determined by cell lactate dehydrogenase (LDH) kit and cell apoptosis evaluated by Hoechst/PI stain. **Results** As compared with control group, the survival rate [(40.16 \pm 3.39)% vs. (101.3 \pm 1.54)%] and the expression level of Nrf2 declined markedly in OGD/R group [(0.47 \pm 0.09) vs. (1.00 \pm 0.00)]. IL-1 beta [(46.55 \pm 9.59) vs. (9.35 \pm 3.33) pg/mL], IL-18 [(35.39 \pm 10.63) vs. (7.85 \pm 3.04) pg/mL] and LDH leakage rate [(0.36 \pm 0.04)% vs. (0.18 \pm 0.08)%], GSDMD-N [(2.24 \pm 0.36) vs. (1.00 \pm 0.00)], NLRP3 [(2.15 \pm 0.23) vs. (1.00 \pm 0.00)], pro-IL-1 beta [(3.08 \pm 0.17) vs. (1.00 \pm 0.00)] and caspase-1 [(2.20 \pm 0.32) vs. (1.00 \pm 0.00)] spiked markedly and the differences were statistically significant ($P < 0.001$). As compared with OGD/R group, the survival rate of Xingnaojing Injection group [(63.69 \pm 11.28)% vs. (40.16 \pm 3.39)%] and the expression level of Nrf2 [(0.89 \pm 0.11) vs. (0.47 \pm 0.09)] rose obviously. The levels of LDH leakage rate [(0.25 \pm 0.07)% vs. (0.36 \pm 0.04)%], IL-1 beta [(33.30 \pm 8.60) vs. (46.55 \pm 9.59) pg/mL], IL-18 [(21.72 \pm 7.50) vs. (35.39 \pm 10.63) pg/mL], GSDMD-N [(1.34 \pm 0.06) vs. (2.24 \pm 0.36)], NLRP3 [(1.25 \pm 0.18) vs. (2.15 \pm 0.23)], pro-IL-1 beta [(1.65 \pm 0.30) vs. (3.08 \pm 0.17)] and caspase-1 [(1.23 \pm 0.15) vs. (2.20 \pm 0.32)] declined markedly and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with Xingnaojing group, the expression level of Nrf2 protein in Xingnaojing Injection + Nrf2 inhibitor group dropped significantly [(0.38 \pm 0.12) vs. (0.89 \pm 0.11)]. The levels of LDH leakage rate [(0.36 \pm 0.07)% vs. (0.25 \pm 0.07)%], IL-1 beta [(53.28 \pm 6.37) vs. (33.30 \pm 8.60) pg/mL], IL-18 [(49.56 \pm 8.87) vs. (21.72 \pm 7.50) pg/mL], GSDMD-N [(1.75 \pm 0.27) vs. (1.34 \pm 0.06)], NLRP3 [(2.22 \pm 0.17) vs. (1.25 \pm 0.18)], pro-IL-1 beta [(3.54 \pm 0.50) vs. (1.65 \pm 0.30)] and caspase-1 [(2.36 \pm 0.28) vs. (1.23 \pm 0.15)] spiked markedly and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Nrf2 inhibitor can reverse the protective effect of Xingnaojing Injection on OGD/R injury-induced pyroptosis of SH-SY5Y cells. And Xingnaojing Injection suppresses OGD/R injury-induced pyroptosis of SH-SY5Y cells through up-regulating Nrf2 protein expression.

【Key words】 Xingnaojing Injection; Pyroptosis; Inflammatory Corpuscles; Cerebral Apoplexy; Nuclear Factor E2 Related Factor 2

Fund program: Traditional Chinese Medicine Research Program of Hunan Province (2020108); Health Commission of Hunan Province (202104040560)

DOI: 10.3760/cma.j.cn101785-202107045-014

神经细胞焦亡是脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI) 过程中导致神经细胞死亡的重要原因^[1]。炎症反应、氧化应激等损伤是激活细胞焦亡的经典途径,抑制神经细胞炎症反应和氧化应激可减轻神经细胞缺血/再灌注损伤^[2]。醒脑静注射液是由冰片、人工麝香、郁金及栀子四味中药提取的复方制剂,临床常用于治疗脑

梗死、脑出血、昏迷等疾病^[3-4]。前期研究表明醒脑静注射液可通过抑制炎症反应和降低氧化应激水平,显著改善脑神经功能^[5-6]。本研究选用与正常神经细胞形态、生理生化功能类似的人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 进行研究,构建氧糖剥夺/再灌注 (oxygen and glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 模型,以模拟体内 CIRI 过程^[7]。从核因子 E2 相

关转录因子 2/NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3/GSDMD (nuclear factor-E2-related factor 2/NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3/gasdermin D, Nrf2/NLRP3/GSDMD) 介导的氧化、炎症信号通路探究醒脑静注射液抗 SH-SY5Y 细胞损伤的作用机制,明确醒脑静注射液抗 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞焦亡与调控 Nrf2/NLRP3/GSDMD 抗氧化信号通路之间的关系。

资料与方法

一、实验材料

SH-SY5Y 细胞株(编号:SCSP-5029)购于中国科学院典型培养物保委员会细胞库;醒脑静注射液购于河南天地药业股份有限公司;Hoechst 33342 和碘化丙啶(propidium iodide, PI)双染试剂盒(CA1120)和 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT, M8180]购于北京索莱宝科技有限公司;pro-IL-1 β 抗体(12703)购于 Cell Signaling Technology (CST)公司; β -actin 抗体购于武汉博士德生物公司;GSDMD 抗体(AF4012)购于 Affinity 公司;白介素 18(interleukin 18, IL-18)(EK0864)和 IL-1 β (EK0329)酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定试剂盒购于武汉博士德生物公司;BeyoECL Plus 化学发光试剂盒(P0018S)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、放射免疫沉淀法裂解液、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法蛋白定量试剂盒、半胱氨酸蛋白酶-1(caspase-1)抗体(AF1681)、NLRP3 抗体(AF2155)购于上海碧云天生物技术有限公司;ML385(S8790)购于 Selleck 公司。

二、实验方法

1. 细胞培养 SH-SY5Y 细胞用含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 Dulbecco's 改良培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)在 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 48 h 后,取对数生长期的细胞进行实验。

2. 细胞活力的检测 建立 OGD/R 模型。除去 SH-SY5Y 细胞完全培养液,用 D-Hanks 液清洗 3 次,更换无糖培养基,加入 CoCl₂ 溶液(终浓度为 400 μ mol/L)。于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 6 h,后更换为完全培养液(含 10% FBS 的高糖培养基),继续培养 24 h。分别使用浓度为 2.5 μ L/mL、

5 μ L/mL、10 μ L/mL、20 μ L/mL 的醒脑静注射液预先处理 SH-SY5Y 细胞 24 h,对照组进行常规培养,各组细胞培养 24 h 后,使用 MTT 法检测 SH-SY5Y 细胞活力。

3. 细胞分组及给药 将 SH-SY5Y 细胞随机分为对照组、OGD/R 组、醒脑静注射液 + OGD/R 组以及醒脑静注射液 + OGD/R + Nrf2 抑制剂组共 4 组,每组实验进行 6 次($n=6$)。对照组不予任何处理;OGD/R 组进行 OGD/R 建模(前已述及);醒脑静注射液 + OGD/R 组、醒脑静注射液 + OGD/R + Nrf2 抑制剂组在建立 OGD/R 模型前,分别使用 10 μ L/mL 醒脑静注射、10 μ L/mL 醒脑静注射 + 2 μ mol/L ML385 预处理 SH-SY5Y 细胞。

4. ELISA 试验 检测细胞培养上清液中 IL-18 和白介素-1 β (interleukin 1 beta, IL-1 β)含量,收集处于对数生长期的各组 SH-SY5Y 细胞,将细胞接种于 24 孔板内。细胞给药处理完毕后,取各组细胞培养上清液,12 000 转/min 离心 5 min,按照 ELISA 试剂盒操作说明测定细胞培养上清中 IL-18 和 IL-1 β 的含量。

5. 细胞乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒法 收集处于对数生长期的各组 SH-SY5Y 细胞,将细胞接种于 96 孔板内,每个样本设 6 个复孔。细胞给药处理完毕后,将细胞培养板用多孔板离心机离心 5 min,分别取各孔的上清液 120 μ L,加入新的 96 孔板中。各孔分别加入 60 μ L LDH 检测工作液,混匀后室温避光孵育 30 min,然后在 490 nm 波长下测定吸光度。使用大于等于 600 nm 的任一波长作为参考波长进行双波长测定,计算 LDH 的渗出率。

6. Hoechst/PI 染色观察细胞膜受损情况 收集处于对数生长期的各组 SH-SY5Y 细胞,将细胞接种于 24 孔板内。细胞给药处理完毕后,各组细胞中依次加入 5 μ L Hoechst 33342 染色液和 5 μ L PI 染色液,4 °C 环境下孵育 30 min。染色后用磷酸盐缓冲盐水(phosphate buffered saline, PBS)洗涤一次,在荧光显微镜下观察并拍照。当细胞膜出现破损时, Hoechst 33342 染液可穿透完整的细胞膜,结合 DNA 可使细胞核显蓝光;PI 染液仅能穿透受损的细胞膜,结合 DNA 和 RNA 可使细胞核显红光。

7. Western blot 检测焦亡相关蛋白 收集处于对数生长期的各组 SH-SY5Y 细胞,加入适量放射免疫沉淀试验(radioimmunoprecipitation assay, RIPA)蛋白裂解液,4 °C 环境下冰浴 30 min,12 000 转/min

离心 15 min。取上清液,采用 BCA 法检测蛋白浓度。配制 10% 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 每个凝胶孔中加入 25 μg 蛋白样品,电泳完成后将蛋白转印至聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF)。5% 脱脂奶粉室温下封闭非特异性抗原 1 h, 加一抗 (β -actin、GSDMD、NLRP3、pro-IL-1 β 、caspase-1 和 Nrf2 抗体, 1 : 500 稀释) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用 TBS-T 洗 3 次后, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1 : 5000 稀释) 孵育 1 h; 再用 TBS-T 冲洗 3 次后, 采用 BeyoECL Plus 化学发光液显影成像。

三、统计学处理

采用 SPSS 20.0 进行统计学分析。正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (整体差异有统计学意义时, 两两比较采用 LSD 法); $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、醒脑静注射液对 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞存活率的影响

OGD/R 组 SH-SY5Y 细胞存活率明显低于对照组, 差异有统计学意义 [(40.16 \pm 3.39) % 比 (101.3 \pm 1.54) % , $P < 0.001$]。2.5 $\mu\text{L/mL}$ 、5 $\mu\text{L/mL}$ 、10 $\mu\text{L/mL}$ 、20 $\mu\text{L/mL}$ 的醒脑静注射液处理的细胞存活率分别为 (39.77 \pm 15.76) %、(43.65 \pm 13.73) %、(63.69 \pm 11.28) %、(63.12 \pm 8.21) %; 2.5 $\mu\text{L/mL}$ 、5 $\mu\text{L/mL}$ 醒脑静注射液处理的细胞存活率与对照组

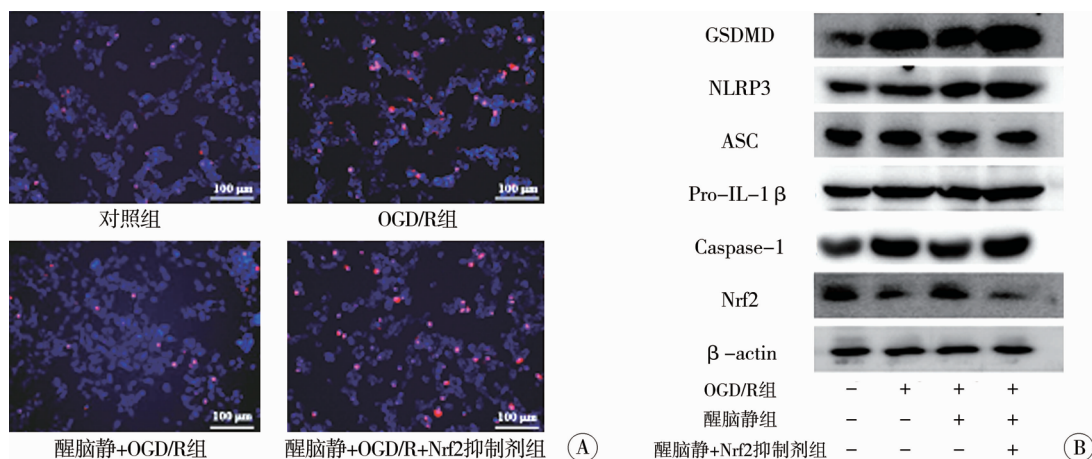
比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 10 $\mu\text{L/mL}$ 、20 $\mu\text{L/mL}$ 醒脑静注射液处理的细胞存活率明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 10 $\mu\text{L/mL}$ 、20 $\mu\text{L/mL}$ 醒脑静注射液处理的细胞存活率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 因此本研究选择 10 $\mu\text{L/mL}$ 醒脑静注射液处理的细胞进行后续实验。

二、Nrf2 抑制剂逆转醒脑静注射液对 OGD/R 诱导后 SH-SY5Y 细胞修复

与对照组比较, OGD/R 组细胞膜破裂程度、LDH、IL-18、IL-1 β 分泌、GSDMD、NLRP3、pro-IL-1 β 、caspase-1 蛋白表达明显升高, Nrf2 蛋白表达明显降低 ($P < 0.01$)。与 OGD/R 组比较, 醒脑静注射液组细胞膜破裂程度、LDH、IL-18、IL-1 β 分泌、GSDMD、NLRP3、pro-IL-1 β 、caspase-1 蛋白表达明显降低, Nrf2 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$)。与醒脑静注射液组比较, 醒脑静注射液 + OGD/R + Nrf2 抑制剂组细胞膜破裂程度、LDH、IL-18、IL-1 β 分泌、GSDMD、NLRP3、pro-IL-1 β 、caspase-1 蛋白表达水平明显增加, Nrf2 蛋白表达明显降低 ($P < 0.01$)。见图 1, 表 1。

讨 论

CIRI 是脑血管疾病致残、致死的重要原因, 研究发现 CIRI 在发生、发展过程中, 神经细胞焦亡是导致神经细胞死亡的重要途径。本研究采用 SH-SY5Y 细胞建立 OGD/R 细胞模型, 发现 SH-SY5Y 细胞存活率下降。CIRI 缺血组织恢复血供后会出现一种非特异性损伤级联反应, 主要涉及炎症反应、氧化应激、钙超载和兴奋性氨基酸毒性等多种



注 A. Hoechst/PI 染色观察细胞膜受损程度; B. Western blot 检测焦亡相关蛋白表达

图 1 醒脑静注射液对 SH-SY5Y 细胞 Hoechst 染色和焦亡相关蛋白表达的影响
Fig.1 Effects of Xingnaojing Injection on Hoechst stain and pyroxis-related protein expression in SH-SY5Y cells

表 1 四组 SH-SY5Y 细胞 LDH、IL-18、IL-1 β 分泌、ASC、焦亡相关蛋白、Nrf2 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)Table 1 Comparison of LDH, IL-18, IL-1 β secretion, ASC, pyroptosis related protein and Nrf2 protein expression in SH-SY5Y cells of 4 groups($\bar{x} \pm s$)

组别	LDH (%)	IL-18 (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	GSDMD	ASC	NLRP3	pro-IL-1 β	caspase-1	Nrf2
对照组($n=6$)	0.18 \pm 0.08	7.85 \pm 3.04	9.35 \pm 3.33	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
OGD/R 组($n=6$)	0.36 \pm 0.04 ^a	35.39 \pm 10.63 ^a	46.55 \pm 9.59 ^a	2.24 \pm 0.36 ^a	1.12 \pm 0.12	2.15 \pm 0.23 ^a	3.08 \pm 0.17 ^a	2.20 \pm 0.32 ^a	0.47 \pm 0.09 ^a
醒脑静组($n=6$)	0.25 \pm 0.07 ^b	21.72 \pm 7.50 ^c	33.30 \pm 8.60 ^b	1.34 \pm 0.06 ^c	1.00 \pm 0.11	1.25 \pm 0.18 ^c	1.65 \pm 0.30 ^c	1.23 \pm 0.15 ^c	0.89 \pm 0.11 ^c
醒脑静 + Nrf2 抑制及组($n=6$)	0.36 \pm 0.07 ^d	49.56 \pm 8.87 ^e	53.28 \pm 6.37 ^d	1.75 \pm 0.27 ^d	1.03 \pm 0.16	2.22 \pm 0.17 ^e	3.54 \pm 0.50 ^e	2.36 \pm 0.28 ^e	0.38 \pm 0.12 ^f

注 LDH:细胞乳酸脱氢酶; IL-18:白介素 18; IL-1 β :白介素-1 β ; GSDMD:GasderminD 蛋白; ASC:凋亡相关斑点样蛋白; NLRP3:NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3; pro-IL-1 β :白介素 1 β 前体; caspase-1:半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1; Nrf2:核因子 E2 相关因子 2; 与对照组比较, ^a 代表 $P < 0.001$; 与 OGD/R 组比较, ^b 代表 $P < 0.05$, ^c 代表 $P < 0.01$; 与醒脑静注射液组比较, ^d 代表 $P < 0.05$, ^e 代表 $P < 0.01$, ^f 代表 $P < 0.001$

复杂的病理生理过程,可激活凋亡、坏死、自噬、焦亡及铁死亡等多种细胞死亡途径,最终诱导神经细胞死亡。因此,研究 CIRI 诱导神经细胞死亡的机制可为探索 CIRI 的治疗提供新方向与新靶点。

细胞焦亡是一种与炎症反应密切相关的细胞死亡形式,caspase-1 介导的经典细胞焦亡途径参与了 CIRI 的发生发展^[8]。焦亡细胞主要表现为细胞不断胀大直至细胞膜破裂,释放大量细胞内容物(LDH、IL-18、IL-1 β 等)^[9]。NLRP3 炎症小体是 IL-18 和 IL-1 β 成熟和分泌的重要平台,NLRP3 炎症小体活化可促进 caspase-1 发生自身剪切和成熟,活化的 caspase-1 切割 GSDMD 形成 GSDMD-N 片段,随后 GSDMD-N 促使细胞膜表面形成孔道,导致细胞肿胀破裂^[10]。另外活化的 caspase-1 还可将 pro-IL-18 和 pro-IL-1 β 裂解为成熟的 IL-18 和 IL-1 β ,并将 IL-18、IL-1 β 释放至细胞外,从而加重炎症反应^[11]。Hoechst/PI 染色显示的细胞膜破裂、LDH、IL-18、IL-1 β 的分泌及 caspase-1 的活化已被广泛应用于检测焦亡的发生。本研究结果表明,SH-SY5Y 细胞在 OGD/R 诱导后细胞存活率下降,而 IL-18、IL-1 β 、LDH 分泌、Hoechst/PI 红色荧光表达、GSDMD、NLRP3、pro-IL-1 β 以及 caspase-1 蛋白表达均增高,提示细胞焦亡参与了 OGD/R 诱导后神经细胞损伤。

氧化应激也是 CIRI 级联机制中的重要环节之一。CIRI 通过破坏细胞内原本的氧化还原动态平衡,促使过量自由基无法被及时清除,诱导细胞发生氧化应激和死亡^[12]。Nrf2 是细胞拮抗氧化应激反应过程中主要的转录激活因子,在防御外源性氧化应激过程中起核心作用。在非应激状态下,Nrf2 可调控许多抗氧化基因的转录或抗氧化酶的表达

水平^[12]。研究表明,Nrf2 介导的氧化应激保护作用对 CIRI 后神经细胞焦亡具有显著的负调控作用^[4]。此外,Liao 等^[13]发现丹参酮冰片酯通过激活 Nrf2 信号通路,减轻了脑缺血再灌注诱导的神经炎症。Xiao 等^[14]报道黄芪甲苷 IV 通过激活 Nrf2 信号通路,抑制 NLRP3/GSDMD 介导的神经细胞焦亡,进而发挥对脑缺血再灌注损伤的保护作用。Nrf2 除了能够介导氧化应激,还可能通过调节 NLRP3/GSDMD 炎症通路中关键蛋白表达,降低脑缺血再灌注后神经细胞焦亡水平。本研究结果也表明 SH-SY5Y 细胞在 OGD/R 处理后细胞存活率下降,抗氧化信号通路关键分子 Nrf2 蛋白表达降低,提示氧化应激参与了 OGD/R 诱导后神经细胞损伤。

现代药理学研究表明,抗炎反应与抗氧化应激是醒脑静注射液发挥抗 CIRI 后神经细胞死亡的重要机制^[5]。本研究结果显示,醒脑静注射液能够提高 OGD/R 后细胞存活率,减少 IL-18、IL-1 β 、LDH 分泌,降低 Hoechst/PI 红色荧光表达以及 GSDMD、NLRP3、pro-IL-1 β 、caspase-1 蛋白表达,表明醒脑静注射液具有抑制神经细胞焦亡的效应。此外,醒脑静注射液能够上调 OGD/R 后细胞 Nrf2 蛋白表达,表明醒脑静注射液可能通过激活 Nrf2 蛋白抑制神经细胞损伤。进一步联用 Nrf2 抑制剂干预 OGD/R 诱导后细胞模型,发现 Nrf2 抑制剂能够逆转醒脑静注射液对 OGD/R 诱导 SH-SY5Y 细胞的 IL-18、IL-1 β 、LDH 分泌、Hoechst/PI 红色荧光表达以及 GSDMD、NLRP3、pro-IL-1 β 、caspase-1 蛋白表达的抑制作用。以上结果表明,醒脑静注射液通过激活 Nrf2/NLRP3/GSDMD 信号通路,发挥对 OGD/R 诱导神经细胞焦亡的保护作用。

综上所述,醒脑静注射液通过激活 Nrf2/NL-
RP3/GSDMD 信号通路,抑制氧糖剥夺/再灌注损伤
诱导的 SH-SY5Y 细胞焦亡。本研究首次发现醒脑
静注射液通过调控 Nrf2/NLRP3/GSDMD 信号通路,
发挥抗细胞焦亡的作用,拓展了醒脑静注射液抗
CIRI 的新机制。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 文海韬负责研究的设计、实施和起草文章;文海韬、
安喆妮、陈小燕进行病例数据收集及分析;文海韬、吴水华负责研究
设计与酝酿,并对文章知识性内容进行审阅。

参 考 文 献

- [1] Zhao J, Piao XY, Wu Y, et al. Cepharanthine attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by reducing NLRP3 inflammasome-induced inflammation and oxidative stress via inhibiting 12/15-LOX signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127: 110151. DOI: 10. 1016/j. biopha. 2020. 110151.
- [2] Wei YY, Lan BD, Zheng T, et al. GSDME-mediated pyroptosis promotes the progression and associated inflammation of atherosclerosis [J]. *Nat Commun*, 2023, 14 (1): 929. DOI: 10. 1038/s41467-023-36614-w.
- [3] 吴京霓, 刘瑞敏, 许丹妮, 等. 基于 GC-MS 技术及网络药理学探讨醒脑静注射液入脑成分抗脑缺血损伤的作用机制 [J]. *中草药*, 2021, 52 (3): 808-820. DOI: 10. 7501/j. issn. 0253-2670. 2021. 03. 024.
Wu JN, Liu RM, Xu DN, et al. Anti-cerebral ischemia mechanisms of brain absorption components of Xingnaojing Injection based upon GC-MS and network pharmacology [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52 (3): 808-820. DOI: 10. 7501/j. issn. 0253-2670. 2021. 03. 024.
- [4] Zhou ZR, Zhao YH, Sun R, et al. Effects of Xingnaojing on serum high-sensitivity c-reactive protein and neuron-specific enolase in patients with acute cerebral hemorrhage: a protocol of systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99 (45): e21379. DOI: 10. 1097/MD. 00000000000021379.
- [5] 王振凤, 田克姚, 刘南海. 醒脑静注射液对 MCAO 大鼠神经功能、神经细胞炎症及氧化应激损伤的影响 [J]. *中国现代医生*, 2020, 58 (36): 36-39.
Wang ZF, Tian KY, Liu NH. Effects of Xingnaojing Injection on nerve function, nerve cell inflammation and oxidative stress injury in MCAO rats [J]. *China Mod Dr*, 2020, 58 (36): 36-39.
- [6] 卢志刚, 黄家彬, 刘芸, 等. 醒脑静注射液对急性脑梗死 Keap1-Nrf2/ARE 氧化应激通路的影响 [J]. *广东医学*, 2016, 37 (20): 3127-3129. DOI: 10. 3969/j. issn. 1001-9448. 2016. 20. 043.
Lu ZG, Huang JB, Liu Y, et al. Effect of Xingnaojing Injection on the Keap1-Nrf2/ARE oxidative stress pathway in acute cerebral infarction [J]. *Guangdong Med J*, 2016, 37 (20): 3127-3129. DOI: 10. 3969/j. issn. 1001-9448. 2016. 20. 043.
- [7] 王文杰, 路娇娇, 马凯丰, 等. 刺五加提取物对人神经细胞 SH-SY5Y 氧糖剥夺再灌注损伤的保护作用研究 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2022, 24 (5): 1772-1780. DOI: 10. 11842/wst. 20211115008.
Wang WJ, Lu JJ, Ma KF, et al. Protective effect of Acanthopanax senticosus extract on SH-SY5Y cells after oxygen and glucose deprivation reperfusion injury [J]. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology*, 2022, 24 (5): 1772-1780. DOI: 10. 11842/wst. 2021115008.
- [8] Shi M, Chen J, Liu TX, et al. Protective effects of remimazolam on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting of NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 413-423. DOI: 10. 2147/DDDT. S344240.
- [9] Yang KL, Bao TT, Zeng JS, et al. Research progress on pyroptosis-mediated immune-inflammatory response in ischemic stroke and the role of natural plant components as regulator of pyroptosis: a review [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 157: 113999. DOI: 10. 1016/j. biopha. 2022. 113999.
- [10] de Sá KSG, Amaral LA, Rodrigues TS, et al. Gasdermin-D activation promotes NLRP3 activation and host resistance to Leishmania infection [J]. *Nat Commun*, 2023, 14 (1): 1049. DOI: 10. 1038/s41467-023-36626-6.
- [11] Yanpiset P, Maneechote C, Sriwichaiin S, et al. Gasdermin D-mediated pyroptosis in myocardial ischemia and reperfusion injury: cumulative evidence for future cardioprotective strategies [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13 (1): 29-53. DOI: 10. 1016/j. apsb. 2022. 08. 007.
- [12] Sun Y, Yang X, Xu LJ, et al. The role of Nrf2 in relieving cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2023, 21 (6): 1405-1420. DOI: 10. 2174/1570159X21666221129100308.
- [13] Liao S, Wu JN, Liu RM, et al. A novel compound DBZ ameliorates neuroinflammation in LPS-stimulated microglia and ischemic stroke rats: role of Akt (Ser473)/GSK3 β (Ser9)-mediated Nrf2 activation [J]. *Redox Biol*, 2020, 36: 101644. DOI: 10. 1016/j. redox. 2020. 101644.
- [14] Xiao L, Dai ZW, Tang WJ, et al. Astragaloside IV alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury through NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis inhibition via activating Nrf2 [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 9925561. DOI: 10. 1155/2021/9925561.

(收稿日期: 2021-07-23)

本文引用格式: 文海韬, 陈小燕, 安喆妮, 等. 醒脑静注射液激活 Nrf2/NLRP3/GSDMD 信号通路抑制氧糖剥夺/再灌注损伤后神经细胞焦亡的研究 [J]. *临床小儿外科杂志*, 2023, 22 (7): 680-685. DOI: 10. 3760/cma. j. cn101785-202107045-014.

Citing this article as: Wen HT, Chen XY, An ZN, et al. Xingnaojing injection suppressed neuronal pyroptosis after oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury through activating Nrf2/NLRP3/GSDMD signaling pathway [J]. *J Clin Ped Sur*, 2023, 22 (7): 680-685. DOI: 10. 3760/cma. j. cn101785-202107045-014.