

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.12.012

甘草查尔酮 A 对局灶性脑缺血再灌注小鼠 Nrf2/HO-1 信号通路和神经炎症反应的影响 *

常江¹ 余华¹ 张晓乐¹ 陈杰¹ 李俊玲^{2Δ}

(1 陕西省中医医院脑病科 陕西 西安 710003; 2 西安市中医医院妇科 陕西 西安 710021)

摘要 目的:探讨甘草查尔酮 A 对局灶性脑缺血再灌注小鼠 Nrf2/HO-1 信号通路和神经炎症反应的影响。方法:体重 23~25 g 的雄性 C57BL/6 小鼠总计 96 只,随机分为 4 组(n=24):假手术对照组(Sham 组)、脑缺血再灌注组(MCAO 组)、溶剂组(Vehicle 组)、甘草查尔酮 A 组(LA 组)。采用大脑中动脉栓塞(MCAO)模型致大鼠脑缺血损伤。72 h 后行神经功能学评分,2,3,5- 三苯基氯化铵(TTC)染色检测脑梗死体积,Western blot 法检测脑 Nrf2、HO-1、TNF- α 、IL-6 蛋白表达水平,TUNEL 染色法检测凋亡细胞数。结果:与 Sham 组比较,MCAO 组和 Vehicle 组小鼠神经功能评分明显降低($P<0.05$),脑梗死体积显著增加($P<0.05$),而核蛋白 Nrf2 和胞浆蛋白 HO-1 蛋白表达水平较低($P<0.05$),炎症因子 IL-6 和 TNF- α 表达水平明显增加($P<0.05$),脑实质炎性细胞浸润显著增多($P<0.05$);与 MCAO 组和 Vehicle 组比较,LA 组小鼠神经功能评分明显增加($P<0.05$),脑梗死体积显著减少($P<0.05$),而核蛋白 Nrf2 和胞浆蛋白 HO-1 蛋白表达水平更高($P<0.05$),炎症因子 IL-6 和 TNF- α 表达水平明显减少($P<0.05$),脑实质炎性细胞浸润明显减少($P<0.05$)。结论:甘草查尔酮 A 可缓解脑缺血再灌注损伤后出现的神经炎症反应及细胞凋亡,进而减轻神经功能障碍和脑梗死体积,其机制可能与激活 Nrf2/HO-1 信号通路相关。

关键词:甘草查尔酮 A;局灶性脑缺血再灌注;Nrf2/HO-1 信号通路;神经炎症反应;细胞凋亡

中图分类号:R743.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)12-2256-06

Effects of Licochalcone A on the Nrf2/HO-1 Signaling Pathway and Neuroinflammation after Cerebral Ischemia/Reperfusion in Mice*

CHANG Jiang¹, YU Hua¹, ZHANG Xiao-le¹, CHEN Jie¹, LI Jun-ling^{2Δ}

(1 Department of Brain Diseases, Shaanxi Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an, Shannxi, 710003, China;

2 Department of Gynecology, Xi'an Traditional Chinese Medicine Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710021, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of licochalcone A on the Nrf2/HO-1 signaling pathway and neuroinflammation after cerebral ischemia/reperfusion in mice. **Methods:** A total of 96 male C57BL/6 mice weighing 23~25 g were randomly divided into 4 groups: sham-operated control group (Sham group), cerebral ischemia/reperfusion group (MCAO group), Vehicle group, licochalcone A group (LA group). The middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was used to produce acute cerebral ischemia in the mice. Seventy-two hours after MCAO surgery, the neurological function was evaluated, the infarct volume was estimated by using triphenyltetrazolium (TTC) staining, the cellular apoptosis was calculated by applying the TUNEL assay, the protein levels of Nrf2, HO-1, TNF- α and IL-6 were determined in the ischemia brain by western blot. **Results:** Compared with the Sham group, the neurological scores of the MCAO group and the Vehicle group were significantly lower($P<0.05$), the cerebral infarction volume was significantly increased ($P<0.05$), and the nuclear protein Nrf2 and cytosolic protein HO-1 protein expression levels were lower($P<0.05$), IL-6 and TNF- α expression levels increased significantly ($P<0.05$), and the infiltration of inflammatory cells in the brain parenchyma was increased($P<0.05$); In comparison with the MCAO group and Vehicle group, the mice in the LA group exhibited a significant increase in neurological function scores($P<0.05$), the cerebral infarct volume was significantly reduced ($P<0.05$), the expression levels of nuclear protein Nrf2 and cytosolic protein HO-1 were elevated($P<0.05$), the expression levels of IL-6 and TNF- α were substantially decreased($P<0.05$), and the infiltration of inflammatory cells in the brain parenchyma was reduced ($P<0.05$). **Conclusions:** The treatment of licochalcone A can alleviate neuroinflammation and apoptosis, thereby reducing neurological dysfunction and infarction volume after cerebral ischemia/reperfusion injury. Its mechanism may be associated with activation of Nrf2/HO-1 signaling pathway.

Key words: Licochalcone A; Cerebral focal ischemia/reperfusion; Nrf2/HO-1 signaling pathway; Neuroinflammation; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R743.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)12-2256-06

* 基金项目:陕西省科技统筹创新工程计划项目(S2015TNSF0025)

作者简介:常江(1970-), 硕士, 副主任医师, 主要研究方向:脑缺血及相关疾病, E-mail: changjiang_2017a@126.com

Δ 通讯作者:李俊玲(1972-), 硕士, 副主任医师, 主要研究方向:脑缺血及相关疾病, 电话:15091757289, E-mail: lijunlacad@163.com

(收稿日期:2018-11-28 接受日期:2018-12-22)

前言

缺血性脑卒中是世界上人类致残和死亡的主要原因之一^[1]。大量研究证实,氧化应激是导致缺血性脑卒中神经损伤的重要原因^[2]。核因子(红细胞衍生 2)-样 2 [Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2, Nrf2] 是抗氧化应激反应的重要转录因子,可以和下游转录因子如血红素加氧酶-1(HO-1)协同作用,发挥抗氧化及抗炎作用^[3,4]。甘草查尔酮 A(Licochalcone A)是从甘草根中分离的黄酮类化合物之一^[5]。甘草查尔酮 A 具有抗炎、抗寄生虫、抗氧化和抗癌等多种生物活性^[5,6]。研究表明,甘草查尔酮类物质可通过激活 Nrf2/HO-1 介导的防御机制缓解细胞氧化应激及炎症反应^[7,8]。因此,本研究旨在观察甘草查尔酮 A 对大脑中动脉栓塞(Middle Cerebral Artery Occlusion, MCAO)模型小鼠神经功能恢复、梗死体积、细胞凋亡及 Nrf2/HO-1 信号通路的影响,从而明确甘草查尔酮 A 对脑缺血再灌注损伤的影响及其具体机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料及设备

甘草查尔酮 A 购自美国 Cayman Chemical 公司;核蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司;Nrf2、HO-1、核蛋白内参 Lamin B、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6 (IL-6) 抗体购自美国 Abcam 公司;TUNEL 染色试剂盒购自美国 Roche 公司;2,3,5-三甲基氯化四氮唑(TTC)购自美国 Sigma 公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒购自南京建成生物工程公司。

1.2 大脑中动脉栓塞(MCAO)模型制备

参照文献^[9],建立小鼠 MCAO 模型。用 6-0 尼龙线栓栓塞右侧大脑中动脉诱导局灶性脑缺血。氯胺酮(100 mg/kg,腹腔注射)麻醉后于显微镜下,分离右颈总动脉、右颈外动脉和右颈内动脉,并在右颈外动脉的起点和远端系上 6-0 缝线。将线栓引入右颈外动脉并向上推入右颈内动脉,直至感觉到阻力(距离颈动脉分叉约 9-10 mm),阻断大脑中动脉。将线栓保持插入 60 min,然后移除线栓并将右颈外动脉永久结扎。Sham 组动物仅暴露动脉但不作栓塞。

1.3 实验分组

体重 23~25 g 雄性 C57BL/6 小鼠,购自西安交通大学医学院实验动物中心。将其随机分为 4 组(n=24),包括假手术对照组(Sham 组)、脑缺血再灌注组(MCAO 组)、溶剂组(Vehicle 组)、甘草查尔酮 A 组(LA 组)。Sham 组动物仅暴露动脉但不栓塞任何动脉;MCAO 组小鼠按前述方法制备 MCAO 模型;Vehicle 组小鼠于模型制备前 1 h 腹腔注射无菌 PBS 溶液 100 μ L,之后制备 MCAO 模型;LA 组小鼠于模型制备前 1 h 腹腔注射甘草查尔酮 A(溶于无菌 PBS)60 mg/kg^[5],之后制备 MCAO 模型。

1.4 神经功能学检测

模型建立后 72 h,使用 Garcia 的 18 分评分法来评估脑缺血再灌注后小鼠神经功能^[10]。量表基于以下六项测试:(1)自发性活动性(0~3 分);(2)四肢运动的对称性(0~3 分);(3)前爪伸展能力(0~3 分);(4)攀爬能力(1~3 分);(5)身体本体感知能力

(1~3 分);(6)对触须触摸的反应(1~3 分)。该评分最小评分为 3 分,最大评分为 18 分。

1.5 TTC 染色

于缺血再灌注后 72 h 后取出大脑,将大脑组织切成 5 个连续的厚度为 1 mm 冠状切片,并在 2% 2,3,5-三苯基氯化铵(TTC)中于 37℃ 温育 15 min,然后转移到含有 4%多聚甲醛的 PBS 液中,在 4℃ 下进行固定。梗死区域 TTC 染色后呈白色,未梗死区域仍呈红色。使用 Image J 软件计算梗死体积。梗死体积=梗死面积 $\times$ 1 mm。校正梗死体积=健侧半球体积-(患侧半球体积-患侧梗死体积),校正梗死体积百分比(%)=(校正梗死体积/大脑总体积) $\times$ 100%。

1.6 Western blot 检测

每组取 6 只小鼠,缺血再灌注后 72 h,过量注射戊巴比妥钠(150 mg/kg)处死小鼠。取出大脑组织,称重后加入裂解液于 4℃ 充分匀浆。离心后用核蛋白提取试剂盒分别提取出核蛋白和胞浆蛋白。核蛋白提取物用于检测 Nrf2 核蛋白表达水平,胞浆蛋白提取物用于检测胞浆 HO-1、TNF- α 、IL-6 的蛋白表达水平。12%凝胶电泳后将蛋白电转至 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶室温封闭后,加入抗 β -actin 抗体(1:500)、抗 Nrf2 抗体(1:1000)、抗 HO-1 抗体(1:800)、抗 TNF- α 抗体(1:600)、抗 IL-6 抗体(1:500)及抗 Lamin B 抗体(1:500),4℃ 孵育过夜。次日,HRP 标记二抗室温孵育 0.5 h,加入显影液并曝光,用 Quantity one 软件分析条带灰度值。Nrf2 核蛋白表达水平以 Nrf2 条带灰度值/Lamin B(核蛋白内参)条带灰度值表示。胞浆蛋白表达水平以目标蛋白条带灰度值/ β -actin 条带灰度值表示。

1.7 TUNEL 凋亡检测

每组取 6 只小鼠,手术后 72 h 用 100 mL 冰 PBS 液经心脏灌注小鼠,取出全脑并在 4%多聚甲醛溶液中后固定,石蜡包埋后使用切片机切成约 5 μ m 厚的切片。TUNEL 染色试剂盒检测脑石蜡包埋切片的凋亡细胞数。室温下用 20 μ g/mL 蛋白酶 K 处理 20 min。最后,在室温下加入 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)10 min。每个切片在荧光显微镜(Leica,德国)200 倍镜下计数受损半球三个不同区域中 TUNEL 阳性细胞个数并计算密度(/mm²)。荧光显微镜下 DAPI 染色细胞核发蓝色荧光,TUNEL 阳性细胞发绿色荧光。

1.8 统计学方法

使用 SPSS 17.0 统计软件行统计学分析,所有数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 四组小鼠脑缺血再灌注后神经功能评分的比较

在整个实验过程中,各组实验动物未发生死亡,体重也未明显减轻。与 Sham 组(18.5 $\pm$ 4.0 分)比较,MCAO 组(7.5 $\pm$ 0.9 分)和 Vehicle 组(7.6 $\pm$ 1.3 分)小鼠神经功能评分明显降低($P < 0.05$);与 MCAO 组和 Vehicle 组比较,LA 组(13.3 $\pm$ 1.6 分)小鼠神经功能评分明显改善($P < 0.05$),见图 1。

2.2 四组小鼠脑缺血再灌注后梗死体积的比较

Sham 组小鼠未观察到梗死灶,而 MCAO 组(32.1 $\pm$ 5.3%)和 Vehicle 组(30.9 $\pm$ 6.0%)小鼠脑缺血再灌注后梗死明显;与

MCAO 组和 Vehicle 组比较,LA 组($16.5 \pm 2.7\%$)小鼠梗死体积显著减少($P < 0.05$),见图 2。

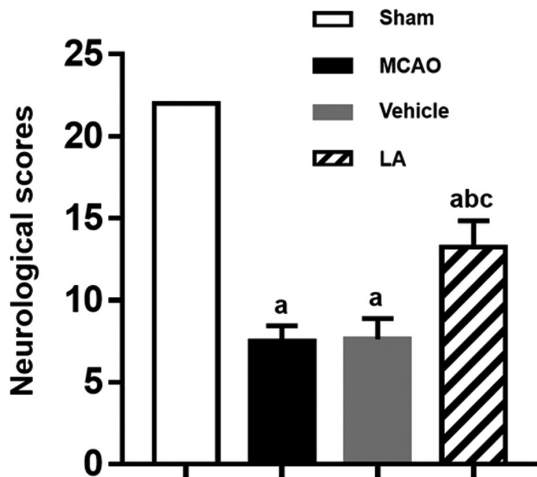


图 1 四组小鼠脑缺血再灌注后神经功能评分的比较(%, $n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Fig.1 Comparison of neurological scores after cerebral ischemia-reperfusion among the four experimental groups (%, $n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Note: Sham: the Sham group, MCAO: the MCAO group, Vehicle: the vehicle group, LA: the licochalcone A group; Compared with Sham group, ^a $P < 0.05$; Compared with MCAO group, ^b $P < 0.05$; Compared with Vehicle group, ^c $P < 0.05$

2.3 四组小鼠脑缺血再灌注后核蛋白 Nrf2 和胞浆蛋白 HO-1

的比较

与 Sham 组 ($\text{Nrf2}: 0.183 \pm 0.013$; $\text{HO-1}: 0.291 \pm 0.038$) 比较, MCAO 组 ($\text{Nrf2}: 0.104 \pm 0.020$; $\text{HO-1}: 0.154 \pm 0.026$) 和 Vehicle 组 ($\text{Nrf2}: 0.116 \pm 0.011$; $\text{HO-1}: 0.148 \pm 0.020$) 小鼠脑核蛋白 Nrf2 和胞浆蛋白 HO-1 蛋白表达水平明显较低($P < 0.05$); 与 MCAO 组和 Vehicle 组比较, LA 组 ($\text{Nrf2}: 0.158 \pm 0.030$; $\text{HO-1}: 0.208 \pm 0.025$) 小鼠脑核蛋白 Nrf2 和胞浆蛋白 HO-1 蛋白表达水平相对增加($P < 0.05$), 见图 3。

2.4 四组小鼠脑缺血再灌注后 TUNEL 阳性凋亡细胞数的比较

与 Sham 组 (2.3 ± 0.2 个/ mm^2) 比较, MCAO 组 (19.0 ± 2.5 个/ mm^2) 和 Vehicle 组 (21.5 ± 3.7 个/ mm^2) 小鼠脑 TUNEL 阳性凋亡细胞明显增多 ($P < 0.05$); 与 MCAO 组和 Vehicle 组比较, LA 组 (8.9 ± 1.4 个/ mm^2) 小鼠脑 TUNEL 阳性凋亡细胞明显减少($P < 0.05$), 见图 4。

2.5 四组小鼠脑缺血再灌注后炎症因子 IL-6 和 TNF- α 表达水平的比较

与 Sham 组 ($\text{IL-6}: 0.099 \pm 0.014$; $\text{TNF-}\alpha: 0.200 \pm 0.014$) 比较, MCAO 组 ($\text{IL-6}: 0.463 \pm 0.049$; $\text{TNF-}\alpha: 0.591 \pm 0.075$) 和 Vehicle 组 ($\text{IL-6}: 0.456 \pm 0.069$; $\text{TNF-}\alpha: 0.522 \pm 0.086$) 小鼠脑炎症因子 IL-6 和 TNF- α 表达水平明显增加 ($P < 0.05$); 与 MCAO 组和 Vehicle 组比较, LA 组 ($\text{IL-6}: 0.217 \pm 0.013$; $\text{TNF-}\alpha: 0.315 \pm 0.034$) 小鼠脑炎症因子 IL-6 和 TNF- α 表达水平显著下降 ($P < 0.05$), 见图 5。

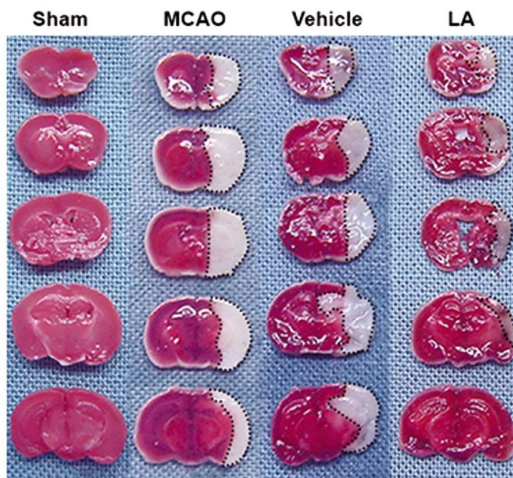


图 2 四组小鼠脑缺血再灌注后梗死体积的比较(%, $n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Fig.2 Comparison of the infarct area after cerebral ischemia-reperfusion among the four experimental groups (%, $n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Note: Sham: the Sham group, MCAO: the MCAO group, Vehicle: the vehicle group, LA: the licochalcone A group; Compared with Sham group, ^a $P < 0.05$; Compared with MCAO group, ^b $P < 0.05$; Compared with Vehicle group, ^c $P < 0.05$. The representative infarct area was encircled by dotted lines.

2.6 四组小鼠脑缺血再灌注后脑实质炎性细胞浸润情况的比较

与 Sham 组 (12.5 ± 2.0 个/ mm^2) 比较, MCAO 组 (101.5 ± 19.7) 和 Vehicle 组 (91.3 ± 12.9 个/ mm^2) 小鼠脑实质炎性细胞浸润显著增多 ($P < 0.05$); 与 MCAO 组和 Vehicle 组比较, LA 组 (54.7 ± 11.4 个/ mm^2) 小鼠脑实质炎性细胞浸润显著减少 ($P < 0.05$), 见图 6。

3 讨论

甘草查尔酮 A 是一种源自甘草根和根茎的天然查尔酮, 具有多种生物活性^[56]。甘草查尔酮 A 属于甘草物种的酚类成

分, 具有显著的抗氧化和氧清除活性^[11]。体外实验研究还表明, 甘草查尔酮 A 具有显著的抗炎活性^[7,12]。例如, 甘草查尔酮 A 作为促炎反应的有效抑制剂, 可抑制脂多糖诱导的粒细胞氧化爆发、前列腺素 E2 和白三烯素 B4 的释放, 及粒细胞和单核细胞衍生的树突细胞分泌的促炎因子 IL-6 和 TNF α 的产生^[7,13]。

然而, 甘草查尔酮 A 在脑缺血再灌注模型中是否具有保护作用尚不清楚。据报道, 在自身免疫性脑脊髓炎和肾损伤动物模型中, 甘草查尔酮 A 可通过抑制 NF κ B 信号通路及 TNF- α 的产生以减轻炎症反应^[14,15]。最新的体外研究表明, 甘草查尔酮 A 可缓解氧糖剥夺造成的皮层神经元凋亡及炎症因子

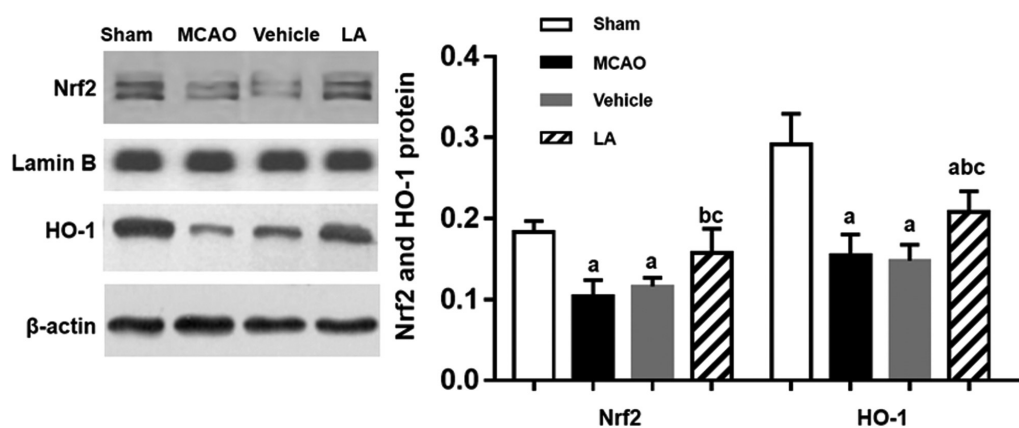


图3 四组小鼠脑缺血再灌注后核蛋白 Nrf2 和胞浆蛋白 HO-1 的比较($n=6, \bar{x} \pm s$)

Fig. 3 Comparison of the protein levels of nucleic Nrf2 and cytosolic HO-1 after cerebral ischemia-reperfusion among the four experimental groups

($n=6, \bar{x} \pm s$)

Note: Sham: the Sham group, MCAO: the MCAO group, Vehicle: the vehicle group, LA: the licochalcone A group; Compared with Sham group, ^a $P<0.05$;

Compared with MCAO group, ^b $P<0.05$; Compared with Vehicle group, ^c $P<0.05$. The nuclear protein level of Nrf2 was normalized to Lamin B;

The cytosolic protein level of HO-1 was normalized to β-actin.

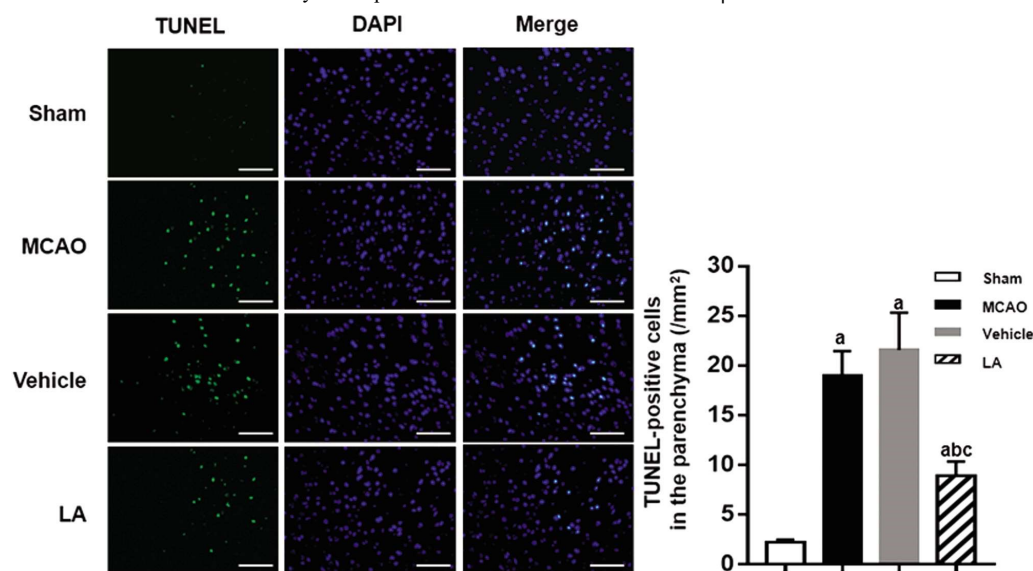


图4 四组小鼠脑缺血再灌注后 TUNEL 阳性凋亡细胞数的比较(/mm², $n=6, \bar{x} \pm s$)

Fig.4 Comparison of TUNEL-positive cells among the four experimental groups (/mm², $n=6, \bar{x} \pm s$)

Note: Sham: the Sham group, MCAO: the MCAO group, Vehicle: the vehicle group, LA: the licochalcone A group; Compared with Sham group, ^a $P<0.05$;

Compared with MCAO group, ^b $P<0.05$; Compared with Vehicle group, ^c $P<0.05$. Scale bars = 50 μm.

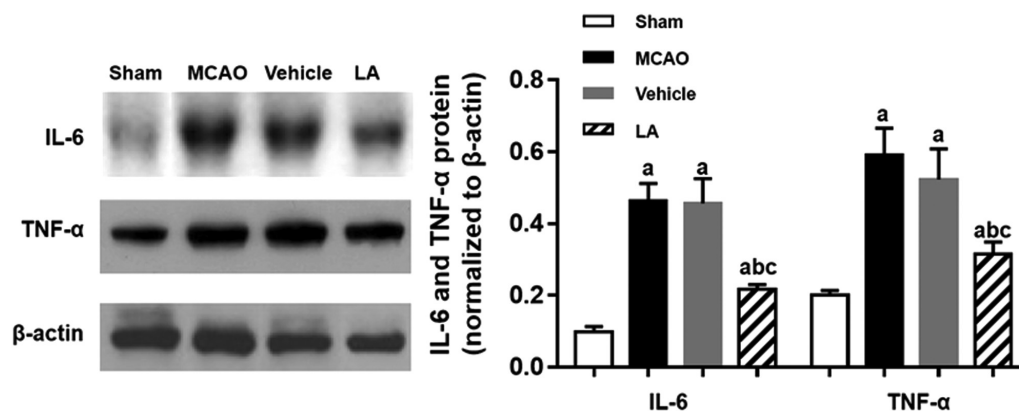


图5 四组小鼠脑缺血再灌注后炎症因子 IL-6 和 TNF-α 表达水平的比较($n=6, \bar{x} \pm s$)

Fig.5 Comparison of the protein levels of IL-6 and TNF-α after cerebral ischemia-reperfusion among the four experimental groups ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Note: Sham: the Sham group, MCAO: the MCAO group, Vehicle: the vehicle group, LA: the licochalcone A group; Compared with Sham group, ^a $P<0.05$;

Compared with MCAO group, ^b $P<0.05$; Compared with Vehicle group, ^c $P<0.05$.

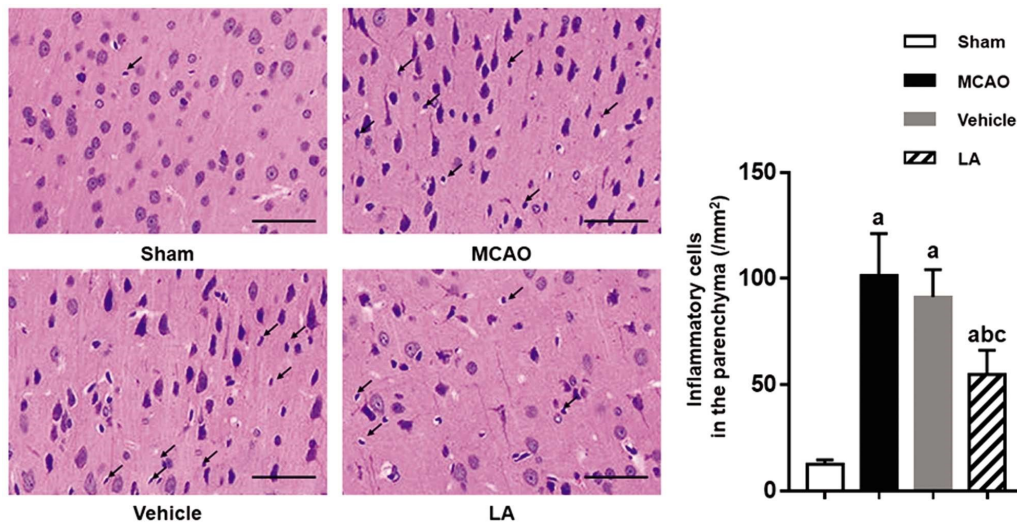


图 6 四组小鼠脑缺血再灌注后脑实质炎性细胞浸润情况的比较 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

Fig.6 Comparison of inflammatory cells in the parenchyma among the four experimental groups (n=6, $\bar{x} \pm s$)

Note: Sham: the Sham group, MCAO: the MCAO group, Vehicle: the vehicle group, LA: the licochalcone A group; Compared with Sham group, ^aP<0.05; Compared with MCAO group, ^bP<0.05; Compared with Vehicle group, ^cP<0.05. The representative inflammatory cells in the brain parenchyma are indicated by black arrows. Scale bars = 50 μ m.

(如 TNF- α 和 IL-6) 释放^[16]。本研究结果表明,与 MCAO 模型组比较,LA 组小鼠神经功能评分更高且梗死体积更小,说明甘草查尔酮 A 对脑缺血再灌注损伤小鼠有神经保护作用。同时,甘草查尔酮 A 可显著减少 MCAO 后小鼠脑炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的表达及 TUNEL 阳性细胞数,提示甘草查尔酮 A 可能通过缓解脑缺血再灌注损伤后出现的炎症反应缓解神经元细胞凋亡。

但是,甘草查尔酮 A 的抗炎及神经保护作用的分子机制尚不清楚。本研究结果提示,甘草查尔酮 A 的脑保护作用可能与 Nrf2/HO-1 信号通路的激活相关。已有文献表明,甘草查尔酮类化合物可通过激活神经元和小胶质细胞内 Nrf2 信号通路缓解帕金森综合征模型小鼠的神经退行性改变^[7]。与之一致,本研究结果显示,MCAO 后 72 h,MCAO 模型组小鼠脑核蛋白 Nrf2 及胞浆蛋白 HO-1 的表达水平显著低于 Sham 组,而 LA 组小鼠脑核蛋白 Nrf2 及胞浆蛋白 HO-1 的表达水平较 MCAO 模型组小鼠显著增加。

Nrf2 是 CNC 转录因子家族的成员,也是一种碱性亮氨酸拉链(bZIP)蛋白,其在细胞核中与一些效应蛋白结合发生异二聚化,再与称为抗氧化反应元件特定 DNA 位点结合^[3,17]。Nrf2 激活后可以启动数百种细胞保护基因的转录,包括谷胱甘肽防御系统和蛋白酶体亚基中的酶^[17]。研究发现,Nrf2 激活所导致的神经保护作用与提高抗氧化能力及促进保护性蛋白质(如脑源性神经营养因子、HO-1、抗凋亡 Bcl-2 分子、抗炎蛋白细胞介素(IL)-10、线粒体转录因子 NRF-1 和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1- α 、铁输出蛋白铁转运蛋白 1 和自噬蛋白 p62 等的表达有关)^[17-19]。目前已有越来越多的临床及科研工作者尝试通过激活 Nrf2 激活来治疗神经系统疾病。这些临床实例包括使用激活褪黑激素激活 Nrf2 以治疗儿童和青少年睡眠障碍,及使用丙戊酸钠恢复脑 Nrf2 以治疗癫痫^[17,20]。

新的研究发现,Nrf2 系统的激活可通过与炎症转录因子 NF- κ B 发挥相互作用,从而发挥抗炎作用^[21]。转录因子 NF- κ B

是炎症的关键调节因子,也可抑制 Nrf2 下游依赖性基因的转录^[22]。在生理条件下,NF- κ B 通过与抑制性激酶,核因子 κ -B 激酶亚基 β 蛋白的抑制剂结合而在细胞质中无活性和隔离^[22]。已有研究显示,NF- κ B 亚基 p65 通过从 Nrf2 剥夺 CREB 结合蛋白(CBP)或募集组蛋白去乙酰化酶 3(HDAC3)来作为 Nrf2 活化的负调节剂来发挥作用^[22]。在另一项研究中,显示 NF- κ B 亚基 p65 可降低 Nrf2 与其同源 DNA 序列的结合并增强了 Nrf2 泛素化,p65 增强 Nrf2 内源性抑制分子 Keap1 的核转位^[23]。而 Keap1 可通过抑制核因子 κ -B 激酶亚基 β 磷酸化和通过自噬作用介导核因子 κ -B 激酶亚基 β 的降解来调节 NF- κ B 信号传导的负调节因子。这就说明,Nrf2 不仅是中枢神经系统中关键的保护性生存因子,也是抗炎的重要调节因子^[24,25]。此外,Nrf2 的下游信号通路分子 HO-1 也具有显著的脑保护及抗细胞凋亡效果。HO-1 属于应激反应蛋白,可将促氧化血红素降解为游离铁、胆绿素(胆红素)和一氧化碳发挥其各种生物活性^[3,26]。研究表明,HO-1 基因缺失可导致凋亡细胞率显著增加^[26]。此外,HO-1 可通过激活抗凋亡因子并维持线粒体功能来预防细胞凋亡^[27]。

已有研究表明,MCAO 后 3 h 至 24 h Nrf2 的表达快速增加,表明启动 Nrf2 蛋白的表达可能是脑缺血早期的一种保护机制^[28]。但由于 Nrf2 内源性抑制分子(如 Keap1)的作用,Nrf2 及其下游转录因子 HO-1 在 48 h 和 72 h 逐渐下降^[28]。而本研究结果显示,甘草查尔酮 A 可增加 MCAO 小鼠脑皮质核蛋白 Nrf2 和胞浆蛋白 HO-1 蛋白表达水平,同时抑制炎症因子 IL-6 和 TNF- α 表达。这就说明,甘草查尔酮 A 在此脑缺血再灌注损伤模型中的保护机制可能和 Nrf2/HO-1 信号激活所诱发的抗炎和抗氧化应激作用相关。

除了 Nrf2/HO-1 信号通路外,甘草查尔酮 A 还有可能通过其他机制发挥脑保护及抗炎作用。①据报道,甘草查尔酮 A 可抑制多种信号传导途径发挥抗炎作用,如 p38 MAPK、STAT3、mTOR 信号通路^[29]。②甘草查尔酮 A 可通过直接作用于小胶质

细胞, 阻断激活的小胶质细胞中的 ERK1/2 和 NF- κ B 信号通路, 抑制小胶质细胞的过度激活, 减少促炎因子 (如 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6) 的释放^[5]。然而, 这些机制在甘草查尔酮 A 脑保护中的作用还有待进一步实验证实。

综上所述, 甘草查尔酮 A 可缓解脑缺血再灌注损伤后出现的神经炎症反应及细胞凋亡, 进而减轻神经功能障碍和脑梗死体积, 其机制可能与激活 Nrf2/HO-1 信号通路相关。

参考文献(References)

- [1] Saunders D H, Greig C A, Mead G E. Physical activity and exercise after stroke: review of multiple meaningful benefits[J]. *Stroke*, 2014, 45 (12): 3742-3747
- [2] Weaver J, Liu K J. Does normobaric hyperoxia increase oxidative stress in acute ischemic stroke? A critical review of the literature[J]. *Med Gas Res*, 2015, 5: 11
- [3] Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(17): 3221-3247
- [4] Buendia I, Michalska P, Navarro E, et al. Nrf2-ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases[J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 157: 84-104
- [5] Huang B, Liu J, Ju C, et al. Licochalcone A Prevents the Loss of Dopaminergic Neurons by Inhibiting Microglial Activation in Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Parkinson's Disease Models[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10)
- [6] Lien L M, Lin K H, Huang L T, et al. Licochalcone A Prevents Platelet Activation and Thrombus Formation through the Inhibition of PLCgamma2-PKC, Akt, and MAPK Pathways[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(7)
- [7] Kim S S, Lim J, Bang Y, et al. Licochalcone E activates Nrf2/antioxidant response element signaling pathway in both neuronal and microglial cells: therapeutic relevance to neurodegenerative disease[J]. *J Nutr Biochem*, 2012, 23(10): 1314-1323
- [8] Lv H, Ren H, Wang L, et al. Lico A Enhances Nrf2-Mediated Defense Mechanisms against t-BHP-Induced Oxidative Stress and Cell Death via Akt and ERK Activation in RAW 264.7 Cells [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 709845
- [9] Tao Z, Zhao H, Wang R, et al. Neuroprotective effect of microRNA-99a against focal cerebral ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *J Neurol Sci*, 2015, 355(1-2): 113-119
- [10] Garcia J H, Wagner S, Liu K F, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation[J]. *Stroke*, 1995, 26(4): 627-634, 635
- [11] Choi A Y, Choi J H, Hwang K Y, et al. Licochalcone A induces apoptosis through endoplasmic reticulum stress via a phospholipase Cgamma1-, Ca(2+)-, and reactive oxygen species-dependent pathway in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Apoptosis*, 2014, 19(4): 682-697
- [12] Su X, Li T, Liu Z, et al. Licochalcone A activates Keap1-Nrf2 signaling to suppress arthritis via phosphorylation of p62 at serine 349[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 115: 471-483
- [13] Kolbe L, Immeyer J, Batzer J, et al. Anti-inflammatory efficacy of Licochalcone A: correlation of clinical potency and in vitro effects[J]. *Arch Dermatol Res*, 2006, 298(1): 23-30
- [14] Hu J, Liu J. Licochalcone A Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Injury by Inhibiting NF-kappaB Activation [J]. *Inflammation*, 2016, 39(2): 569-574
- [15] Fontes L B, Dos S D D, de Carvalho L S, et al. Immunomodulatory effects of licochalcone A on experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2014, 66(6): 886-894
- [16] Liu X, Ma Y, Wei X, et al. Neuroprotective effect of licochalcone A against oxygen-glucose deprivation/reperfusion in rat primary cortical neurons by attenuating oxidative stress injury and inflammatory response via the SIRT1/Nrf2 pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(4): 3210-3219
- [17] Sandberg M, Patil J, D'Angelo B, et al. NRF2-regulation in brain health and disease: implication of cerebral inflammation [J]. *Neuropharmacology*, 2014, 79: 298-306
- [18] Mendez-David I, Tritschler L, Ali Z E, et al. Nrf2-signaling and BD-NF: A new target for the antidepressant-like activity of chronic fluoxetine treatment in a mouse model of anxiety/depression [J]. *Neurosci Lett*, 2015, 597: 121-126
- [19] Holmstrom K M, Kostov R V, Dinkova-Kostova A T. The multifaceted role of Nrf2 in mitochondrial function [J]. *Curr Opin Toxicol*, 2016, 1: 80-91
- [20] Cummings C. Melatonin for the management of sleep disorders in children and adolescents [J]. *Paediatr Child Health*, 2012, 17 (6): 331-336
- [21] Patel H, McIntire J, Ryan S, et al. Anti-inflammatory effects of astroglial alpha7 nicotinic acetylcholine receptors are mediated by inhibition of the NF-kappaB pathway and activation of the Nrf2 pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 192
- [22] Wardyn J D, Ponsford A H, Sanderson C M. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF-kappaB response pathways [J]. *Biochem Soc Trans*, 2015, 43(4): 621-626
- [23] Sun C Y, Xu L Q, Zhang Z B, et al. Protective effects of pogostone against LPS-induced acute lung injury in mice via regulation of Keap1-Nrf2/NF-kappaB signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 32: 55-61
- [24] Xue F, Huang J W, Ding P Y, et al. Nrf2/antioxidant defense pathway is involved in the neuroprotective effects of Sirt1 against focal cerebral ischemia in rats after hyperbaric oxygen preconditioning [J]. *Behav Brain Res*, 2016, 309: 1-8
- [25] Buendia I, Michalska P, Navarro E, et al. Nrf2-ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases[J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 157: 84-104
- [26] Lin S H, Song W, Cressatti M, et al. Heme oxygenase-1 modulates microRNA expression in cultured astroglia: implications for chronic brain disorders[J]. *Glia*, 2015, 63(7): 1270-1284
- [27] Yang Y, Wang J, Li Y, et al. HO-1 Signaling Activation by Pterostilbene Treatment Attenuates Mitochondrial Oxidative Damage Induced by Cerebral Ischemia Reperfusion Injury[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53 (4): 2339-2353
- [28] Yang C, Zhang X, Fan H, et al. Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia[J]. *Brain Res*, 2009, 1282: 133-141
- [29] Chu X, Ci X, Wei M, et al. Licochalcone a inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response in vitro and in vivo [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(15): 3947-3954