

• 论 著 •

蛇葡萄素通过调节 JAK2/STAT3 信号通路减轻 OGD/R 诱导的神经元损伤

弋海群¹, 谢娟², 张象霞³, 何贵华^{1△}, 张伟¹

重庆市荣昌区人民医院: 1. 儿科; 2. 质管办; 3. 院感科, 重庆 402460

摘要:目的 探讨蛇葡萄素(AMP)对氧糖剥夺/再灌注(OGD/R)诱导的神经元损伤的影响及其作用机制,为新生儿缺氧缺血性脑损伤的研究奠定基础。方法 分离并体外培养新生 SD 大鼠神经元细胞,分为 5 组:对照组(AMP 浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$)、OGD/R 组、AMP 低剂量组(OGD/R 处理+AMP 20 $\mu\text{mol/L}$)、AMP 高剂量组(OGD/R 处理+AMP 30 $\mu\text{mol/L}$)、JAK2/STAT3 激活剂组(OGD/R 处理+AMP 30 $\mu\text{mol/L}$ +Coumermycin A1 10 $\mu\text{mol/L}$)。CCK-8 法检测不同处理组细胞活力;乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒检测培养基中 LDH 活性;流式细胞术检测细胞凋亡率;酶联免疫吸附试验检测白细胞介素 6(IL-6)、白细胞介素 10(IL-10)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平;试剂盒检测活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平;Western blotting 检测凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、酶切含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(C-caspase-3)、酪氨酸激酶 2(JAK2)、磷酸化 JAK2(p-JAK2)、信号传导及转录活化因子 3(STAT3)、磷酸化 STAT3(p-STAT3)表达情况。结果 与 AMP 浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较,AMP 浓度为 5~30 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞活力比较差异无统计学意义($P>0.05$),AMP 浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 细胞活力明显下降($P<0.05$)。与对照组比较,OGD/R 组细胞活力、SOD、IL-10、Bcl-2 水平明显下降,LDH 活性、细胞凋亡率、ROS 荧光强度、MDA、IL-6、TNF- α 、Bax、C-caspase-3、p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 水平明显升高($P<0.05$)。与 OGD/R 组比较,AMP 低、高剂量组神经元细胞活力、SOD、IL-10、Bcl-2 水平上升,LDH 活性、细胞凋亡率、ROS 荧光强度、MDA、IL-6、TNF- α 、Bax、C-caspase-3、p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 水平下降($P<0.05$),而 JAK2/STAT3 激活剂可逆转 AMP 对 OGD/R 诱导的神经元细胞损伤的保护作用。结论 AMP 通过减少氧化应激和炎症反应减轻 OGD/R 诱导的神经元细胞损伤,其作用机制可能与抑制 JAK2/STAT3 信号通路磷酸化有关。

关键词:蛇葡萄素; 氧糖剥夺/再灌注; 酪氨酸激酶 2; 信号传导及转录活化因子 3; 神经元损伤

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2024.01.017 **中图法分类号:**Q421

文章编号:1673-4130(2024)01-0089-06 **文献标志码:**A

Ampelopsin alleviates OGD/R induced neuronal damage by regulating JAK2/STAT3 signaling pathway

YI Haiqun¹, XIE Juan², ZHANG Xiangxia³, HE Guihua^{1△}, ZHANG Wei¹

1. Department of Pediatrics; 2. Quality Management Office; 3. Department of Hospital Infection, Chongqing Rongchang District People's Hospital, Chongqing 402460, China

Abstract: Objective To investigate the impact of ampelopsin (AMP) on oxygen glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) induced neuronal damage and its mechanism, and to lay a foundation for the study of neonatal hypoxic-ischemic brain damage. **Methods** Neurons of newborn SD rats were isolated and cultured in vitro, and they were divided into 5 groups: control group (AMP 0 $\mu\text{mol/L}$), OGD/R group, low dose AMP group (OGD/R+AMP 20 $\mu\text{mol/L}$), high dose AMP group (OGD/R+AMP 30 $\mu\text{mol/L}$) and JAK2/STAT3 activator group (OGD/R+AMP 30 $\mu\text{mol/L}$ +Coumermycin A1 10 $\mu\text{mol/L}$). CCK-8 method was used to detect the cell viability of different treatment groups, the lactate dehydrogenase (LDH) kit was used to detect the cell activity of LDH in the medium, flow cytometry was used to detect the apoptosis rate, enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factor α (TNF- α), the kit was used to detect the levels of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD), and Western blotting was used to detect the expression of apoptosis related proteins B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), enzymatic cleavage of cysteine containing aspartate protein hydrolase-3 (C-caspase-3), tyrosine kinase 2 (JAK2), phosphorylated

JAK2 (p-JAK2), signal transduction and transcription activating factor 3 (STAT3) and phosphorylated STAT3 (p-STAT3). **Results** Compared with the concentration of AMP of 0 $\mu\text{mol/L}$, the cell viability in concentration of AMP of 5–30 $\mu\text{mol/L}$ was not obvious different ($P>0.05$), when the concentration of AMP was 40 $\mu\text{mol/L}$, the cell viability decreased obviously ($P<0.05$). Compared with the control group, the cell viability, the levels of SOD fluorescence intensity, IL-10 and Bcl-2 in OGD/R group decreased obviously, the LDH activity, cell apoptosis rate, the levels of ROS, MDA, IL-6, TNF- α , Bax, C-caspase-3, p-JAK2/JAK2, and p-STAT3/STAT3 increased obviously ($P<0.05$). Compared with OGD/R group, the cell viability, the levels of SOD fluorescence intensity, IL-10 and Bcl-2 in low and high dose AMP groups increased, the LDH activity, cell apoptosis rate, the levels of ROS, MDA, IL-6, TNF- α , Bax, C-caspase-3, p-JAK2/JAK2, and p-STAT3/STAT3 decreased ($P<0.05$), and JAK2/STAT3 activator was able to reverse the protective effect of AMP on OGD/R induced neuronal. **Conclusion** AMP attenuates OGD/R induced neuronal by reducing oxidative stress and inflammatory response, and its mechanism may be related to inhibition of JAK2/STAT3 signal pathway phosphorylation.

Key words: ampelopsin; oxygen glucose deprivation/reperfusion; tyrosine kinase 2; signal transducer and activator of transcription 3; nneuron damage

新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)是由于早产儿或足月儿出生前或出生时长期脑缺氧缺血引起的临床综合征,其死亡率为10%~60%,幸存者中的23%可能会存在长期神经系统后遗症如智力低下、认知障碍、发育迟缓、脑瘫和癫痫等^[1]。目前,低温治疗被认为是治疗HIE的唯一办法,但其治疗有效率只有50%^[2]。因此,进一步了解新生儿HIE的发病机制,寻找更有效的治疗方法至关重要。蛇葡萄素(AMP)又称二氢杨梅素(DHM),是一种来自中草药天然类黄酮化合物,具有包括抗菌、抗炎、抗氧化、抗高血压、保护肝脏和抗癌等多种生物活性和药理特性^[3]。已有研究报道,AMP在多种神经性疾病中发挥作用,且对氧糖剥夺/再灌注(OGD/R)诱导的神经元细胞损伤有保护作用^[4]。酪氨酸激酶2(JAK2)是蛋白质-酪氨酸激酶家族的成员,是炎症反应和细胞增殖分化的重要调节剂^[5]。信号传导及转录活化因子3(STAT3)也参与细胞凋亡、增殖和分化,其磷酸化激活受JAK2的调节^[6]。已有研究表明,JAK2/STAT3通路的磷酸化/活化与神经保护相关的信号通路之间存在联系,且调节JAK2/STAT3信号通路可保护OGD/R诱导的细胞损伤^[7]。本研究通过构建体外新生大鼠OGD/R诱导的神经元细胞模型,探讨AMP对神经元细胞损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 材料来源 选择24 h新生SD大鼠,购自广东南模生物科技有限公司,许可证编号:SCXK(粤)2022-0062。

1.2 仪器与试剂 胰蛋白酶、胎牛血清(FBS)、DEME培养基、Neurobasal培养基、B27(北京索莱宝科技有限公司);CCK-8检测试剂盒、Annexin VFITC/PI检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(上海通蔚实业有

限公司);活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(美国默克公司);酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素10(IL-10)、肿瘤坏死因子(TNF)- α (上海碧云天生物技术有限公司);抗体微相关蛋白2(MAP-2)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、酶切含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(C-caspase-3)、JAK2、磷酸化JAK2(p-JAK2)、STAT3、磷酸化信号传导及转录活化因子3(p-STAT3)和GAPDH(美国Abcam公司);二抗山羊抗兔IgG(南京建成生物工程研究所);JAK2/STAT3激活剂Coumermycin A1(美国MedChemExpress公司)。流式细胞仪(美国BD公司);蛋白电泳仪(美国Bio-rad公司);酶标仪(上海天能生命科学有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 神经元细胞培养 将新生SD大鼠断头处死,取出双侧海马组织,剪碎,胰蛋白酶消化后置于含10% PBS的DMEM培养基终止消化,37℃、5% CO₂培养4 h后置于含2% B27的Neurobasal培养基培养^[8]。神经元培养第7天,用免疫荧光染色加入MAP-2抗体(呈红色),显微镜下观测MAP-2荧光细胞数,计算神经元细胞的纯度。

1.3.2 神经元细胞 OGD/R 模型构建与分组 将培养7 d的神经元细胞置于含有94% N₂、5% CO₂和1% O₂的三气培养箱中37℃培养4 h。随后更换为Neurobasal培养基在相同条件下培养24 h,构建神经元OGD/R损伤模型^[8]。将神经元细胞随机分为:对照组(AMP浓度为0 $\mu\text{mol/L}$),OGD/R组(OGD/R处理),AMP低剂量组(OGD/R处理+AMP 20 $\mu\text{mol/L}$),AMP高剂量组(OGD/R处理+AMP 30 $\mu\text{mol/L}$),JAK2/STAT3激活剂组(OGD/R处理+AMP 30 $\mu\text{mol/L}$ +Coumermycin A1 10 $\mu\text{mol/L}$)。

其中 AMP 于 OGD/R 再灌注开始阶段以适量浓度溶于培养基,其使用剂量参照以往研究^[4]。而 Coumermycin A1 于再灌注开始阶段和复氧后处理细胞。

1.3.3 CCK-8 法检测细胞活力 将神经元细胞加入 96 孔板中,每孔 1×10^4 个细胞,不同浓度 AMP(0、5、10、20、30、40 $\mu\text{mol/L}$)培养 24 h 后,实验同时设无细胞对照组(空白),加入 10% CCK-8 溶液(10 μL)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h,酶标仪于 450 nm 处测量吸光度(A),并计算细胞活力($\%$)= $(A_{\text{神经元细胞}} - A_{\text{空白}})/(A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})\times 100\%$ 。每组 6 个重复。

将对照组和暴露于 OGD/R 的各组细胞加入 96 孔板中,每孔 1×10^4 个细胞,培养 24 h 后加入 10% CCK-8 溶液(10 μL)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h,酶标仪于 450 nm 处测量吸光度,细胞活力计算方法同上。每组 6 个重复。

1.3.4 培养基中 LDH 活性检测 收集各组神经元细胞复氧复糖 24 h 后的培养液,离心取上清,按照 LDH 诊断试剂盒测量培养基中 LDH,使用微孔板分光光度计在 450 nm 波长下计算 LDH 活性,培养基中 LDH 活性越高,代表细胞释放的 LDH 越多,损伤越严重。

1.3.5 流式细胞术检测细胞凋亡 将各组细胞加入 6 孔板中,每孔 1×10^7 个细胞,培养 12 h,按照 AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒说明书逐步进行染色,用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.3.6 氧化应激的测定 将各组细胞使用相应的试剂盒测定 ROS 荧光强度、MDA 和 SOD 的水平。ROS 采用 FITC 荧光检测,SOD 的 A 值用酶标仪分别在 450 nm 处测定,MDA 的 A 值在 532 nm 处测定。

1.3.7 炎症因子水平的测定 将各组细胞离心取上清,用 ELISA 试剂盒检测 IL-6、IL-10、TNF- α 水平。

1.3.8 Western blotting 检测蛋白水平 将各组细胞破碎后提取总蛋白,用 BCA 试剂盒进行浓度定量,按步骤将蛋白 SDS-PAGE 电泳、转膜,5%脱脂奶粉封闭 2 h,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下加入一抗 Bcl-2、Bax、C-caspase-3、JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 (1 : 2 000) 和 GAPDH 过夜孵育,清洗,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下加入二抗山羊抗兔 IgG(1 : 1 000),孵育 2 h。用 ECL 发光显影,观察拍照,各条带灰度值用 Image J 软件处理分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据处理及统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,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,进一步两两比较采用 SNK- q 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 神经元细胞纯度鉴定 海马神经元免疫荧光实验结果显示,MAP-2 主要存在于细胞体和树突,为红

色荧光。随机选取 10 个视野下的 100 个细胞,统计海马神经元的阳性细胞数,神经元细胞的纯度为 $(93.61\pm 3.58)\%$,见图 1。

2.2 不同浓度 AMP 对细胞活性的影响 与 AMP 浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较,AMP 浓度在 5~30 $\mu\text{mol/L}$ 时,不影响神经元细胞的活力($P>0.05$),当 AMP 浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 时,神经元细胞活力明显下降($P<0.05$)。见表 1。

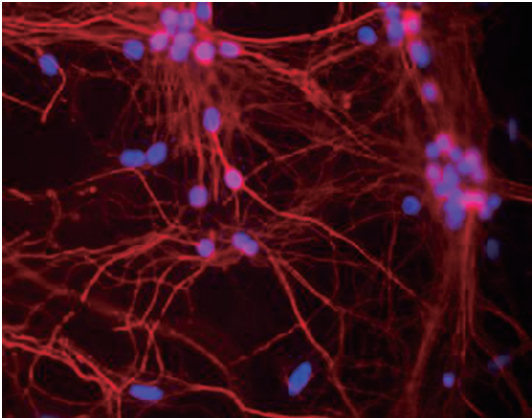


图 1 海马神经元 MAP-2 免疫荧光染色的鉴定($\times 200$)

表 1 不同浓度 AMP 对细胞活力的影响($\bar{x}\pm s, \%$)

AMP 浓度($\mu\text{mol/L}$)	<i>n</i>	细胞活力
0	6	100.00 $\pm$ 0.00
5	6	99.97 $\pm$ 1.26
10	6	99.38 $\pm$ 2.61
20	6	98.42 $\pm$ 3.89
30	6	98.13 $\pm$ 5.38
40	6	89.73 $\pm$ 8.37*

注:与 AMP 浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较,* $P<0.05$ 。

2.3 各组细胞活力和培养基中 LDH 活性的变化 与对照组比较,OGD/R 组细胞活力明显下降,培养基中 LDH 活性明显升高($P<0.05$);与 OGD/R 组比较,AMP 低、高剂量组细胞活力明显升高,培养基中 LDH 活性明显下降($P<0.05$);与 AMP 高剂量组比较,JAK2/STAT3 激活剂组细胞活力明显下降,培养基中 LDH 活性明显升高($P<0.05$)。见表 2。

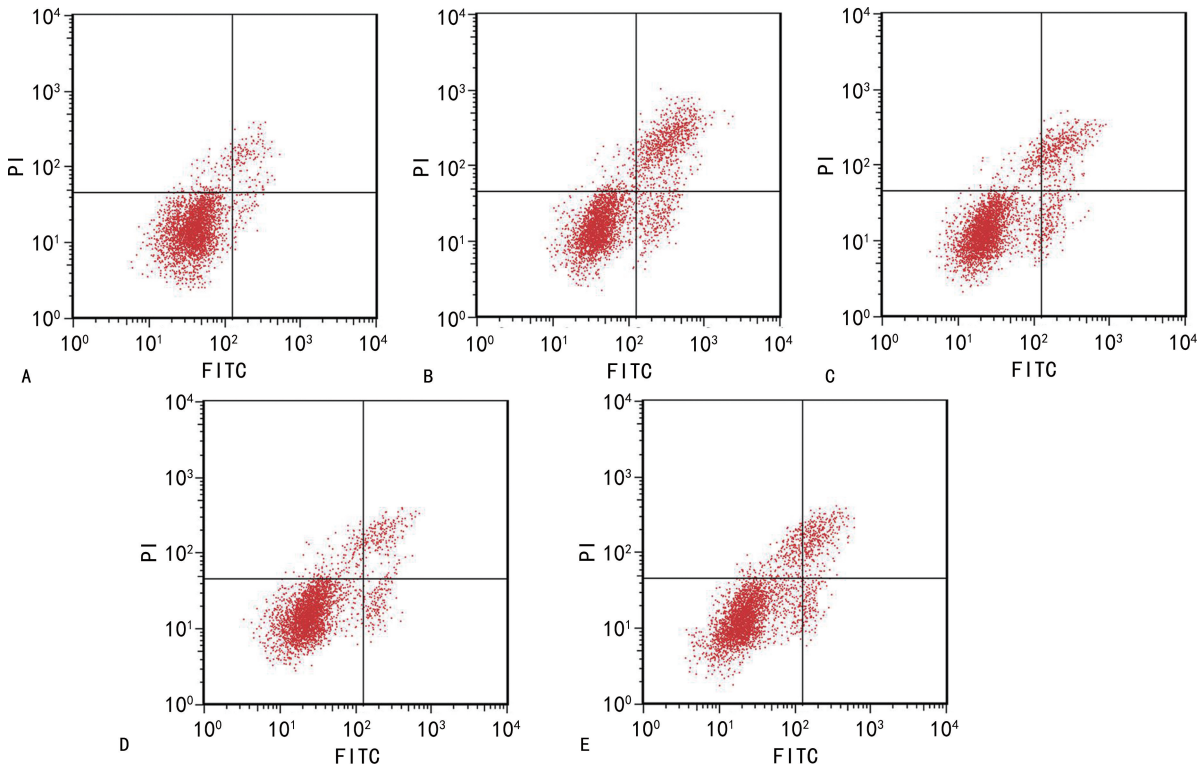
表 2 各组细胞活力和培养基中 LDH 活性的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	细胞活力($\%$)	LDH(U/mL)
对照组	6	100.00 $\pm$ 0.00	49.39 $\pm$ 9.73
OGD/R 组	6	56.37 $\pm$ 5.18*	185.26 $\pm$ 18.97*
AMP 低剂量组	6	77.48 $\pm$ 6.39 [#]	136.47 $\pm$ 13.58 [#]
AMP 高剂量组	6	85.36 $\pm$ 7.19 [#]	98.61 $\pm$ 8.57 [#]
JAK2/STAT3 激活剂组	6	62.68 $\pm$ 5.27 ^{&}	158.29 $\pm$ 16.24 ^{&}

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与 OGD/R 组比较,[#] $P<0.05$;与 AMP 高剂量组比较,[&] $P<0.05$ 。

2.4 各组细胞凋亡情况 与对照组比较,OGD/R 组

细胞凋亡率明显升高($P<0.05$);与 OGD/R 组比较,AMP 低、高剂量组细胞凋亡率明显下降($P<0.05$);与 AMP 高剂量组比较,JAK2/STAT3 激活剂组细胞凋亡率明显升高($P<0.05$),见图 2、表 3。



注:A 为对照组;B 为 OGD/R 组;C 为 AMP 低剂量组;D 为 AMP 高剂量组;E 为 JAK2/STAT3 激活剂组。

图 2 流式细胞术检测各组细胞凋亡情况

表 3 各组细胞凋亡情况($\bar{x}\pm s, \%$)		
组别	<i>n</i>	凋亡率
对照组	6	5.48±0.62
OGD/R 组	6	39.68±5.17 [*]
AMP 低剂量组	6	21.47±4.62 [#]
AMP 高剂量组	6	12.73±3.64 [#]
JAK2/STAT3 激活剂组	6	30.42±6.15 ^{&}

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与 OGD/R 组比较,[#] $P<0.05$;与 AMP 高剂量组比较,[&] $P<0.05$ 。

2.5 各组细胞氧化应激指标水平变化 与对照组比较,OGD/R 组细胞 ROS 荧光强度、MDA 水平明显升高,SOD 水平明显降低($P<0.05$);与 OGD/R 组比较,AMP 低、高剂量组细胞 ROS 荧光强度、MDA 水平明显下降,SOD 水平明显升高($P<0.05$);与 AMP 高剂量组比较,JAK2/STAT3 激活剂组细胞 ROS 荧光强度、MDA 水平明显升高,SOD 水平明显降低($P<0.05$)。见表 4。

2.6 各组细胞炎症因子水平变化 与对照组比较,OGD/R 组细胞 IL-6、TNF- α 水平明显升高,IL-10 水平明显降低($P<0.05$);与 OGD/R 组比较,AMP 低、高剂量组细胞 IL-6、TNF- α 水平明显下降,IL-10 水平明显升高($P<0.05$);与 AMP 高剂量组比较,JAK2/STAT3 激活剂组细胞 IL-6、TNF- α 水平明显升高,

IL-10 水平明显降低($P<0.05$)。见表 5。

表 4 各组细胞氧化应激指标水平变化($\bar{x}\pm s$)				
组别	<i>n</i>	ROS 荧光强度 ($\times 10^3$)	MDA (U/mL)	SOD (U/mL)
对照组	6	22.83±1.68	11.05±1.59	57.29±7.13
OGD/R 组	6	35.19±4.72 [*]	25.29±4.36 [*]	14.82±3.61 [*]
AMP 低剂量组	6	26.36±2.94 [#]	17.35±3.84 [#]	35.26±4.17 [#]
AMP 高剂量组	6	24.71±3.16 [#]	13.46±2.13 [#]	46.58±5.04 [#]
JAK2/STAT3 激活剂组	6	32.08±4.28 ^{&}	22.73±4.18 ^{&}	21.87±2.81 ^{&}

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与 OGD/R 组比较,[#] $P<0.05$;与 AMP 高剂量组比较,[&] $P<0.05$ 。

表 5 各组细胞炎症因子水平变化($\bar{x}\pm s, \text{pg/mL}$)				
组别	<i>n</i>	IL-6	IL-10	TNF- α
对照组	6	38.51±6.68	21.09±2.68	1.72±0.27
OGD/R 组	6	85.92±7.53 [*]	5.26±0.93 [*]	3.82±0.61 [*]
AMP 低剂量组	6	61.49±7.38 [#]	11.85±1.40 [#]	2.56±0.57 [#]
AMP 高剂量组	6	43.71±5.93 [#]	16.63±1.72 [#]	2.21±0.48 [#]
JAK2/STAT3 激活剂组	6	70.28±8.62 ^{&}	9.83±0.78 ^{&}	3.35±0.60 ^{&}

注:与对照组比较,^{*} $P<0.05$;与 OGD/R 组比较,[#] $P<0.05$;与 AMP 高剂量组比较,[&] $P<0.05$ 。

2.7 各组细胞蛋白表达水平变化 与对照组比较,

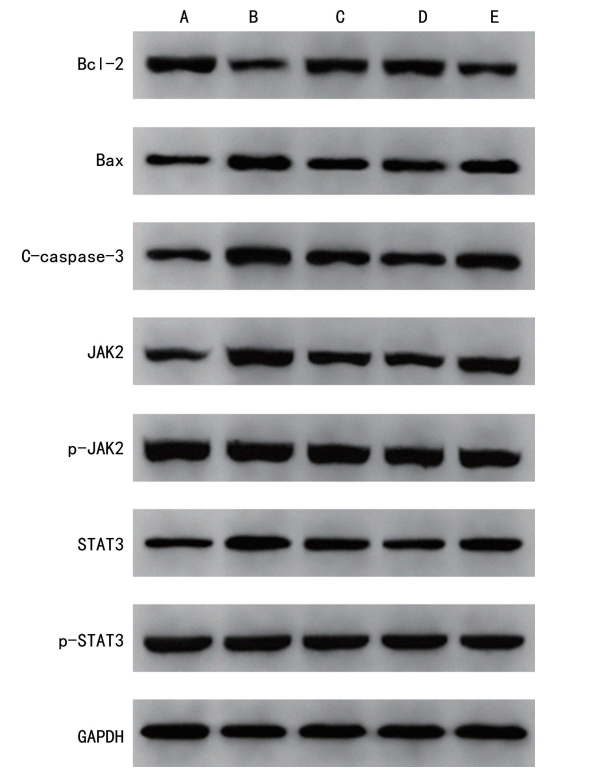
OGD/R 组细胞 Bax、C-caspase-3、p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 蛋白水平明显升高, Bcl-2 蛋白水平明显降低($P<0.05$); 与 OGD/R 组比较, AMP 低、高剂量组细胞 Bax、C-caspase-3、p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 蛋白水平明显下降, Bcl-2 蛋白水平

明显升高($P<0.05$); 与 AMP 高剂量组比较, JAK2/STAT3 激活剂组细胞 Bax、C-caspase-3、p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 水平明显升高, Bcl-2 蛋白水平明显降低($P<0.05$)。见表 6、图 3。

表 6 各组细胞蛋白表达水平变化($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH	C-caspase-3/GAPDH	p-JAK2/JAK2	p-STAT3/STAT3
对照组	6	0.98±0.08	0.58±0.06	0.64±0.10	0.33±0.05	0.46±0.07
OGD/R 组	6	0.56±0.06 [*]	1.16±0.18 [*]	1.58±0.21 [*]	0.94±0.15 [*]	0.92±0.11 [*]
AMP 低剂量组	6	0.75±0.09 [#]	0.83±0.14 [#]	1.02±0.11 [#]	0.54±0.08 [#]	0.68±0.06 [#]
AMP 高剂量组	6	0.89±0.10 [#]	0.69±0.10 [#]	0.79±0.09 [#]	0.42±0.07 [#]	0.56±0.07 [#]
JAK2/STAT3 激活剂组	6	0.64±0.07 ^{&}	0.98±0.12 ^{&}	1.26±0.13 ^{&}	0.82±0.09 ^{&}	0.81±0.06 ^{&}

注:与对照组比较, ^{*} $P<0.05$; 与 OGD/R 组比较, [#] $P<0.05$; 与 AMP 高剂量组比较, [&] $P<0.05$ 。



注: A 为对照组; B 为 OGD/R 组; C 为 AMP 低剂量组; D 为 AMP 高剂量组; E 为 JAK2/STAT3 激活剂组。

图 3 各组细胞蛋白表达水平变化

3 讨 论

HIE 是全球范围内新生儿死亡和残疾的主要原因, 其病理生理因素包括炎症、兴奋性毒性、氧化应激、神经元细胞死亡等^[9]。但目前仍然缺乏有效的 HIE 治疗方法, 因此迫切需要寻找一种新的治疗策略来改善神经元损伤, 从而恢复神经功能。本研究发现, OGD/R 诱导的神经元细胞活力下降, LDH 活性和神经元凋亡率升高, 表明 OGD/R 会导致神经元细胞损伤。AMP 是一种天然存在于葡萄、水果、蔬菜和草药中的类黄酮化合物, 因其具有抗氧化应激、抗炎、抗癌、抗菌、抗凋亡和神经保护等生物活性而被广泛

应用^[10]。已有研究发现, AMP 对 OGD/R 诱导的神经元细胞损伤有较好的保护作用, 李娜等^[4]发现, AMP 能抑制 OGD/R 诱导的小鼠神经元细胞氧化应激损伤。本研究结果显示, AMP 能提高 OGD/R 导致的神经元细胞活力下降, 降低 LDH 活性和神经元细胞凋亡率, 与以往报道相似, 提示 AMP 能减少神经元细胞损伤。

炎症、氧化应激在 OGD/R 造成的脑损伤过程中起着非常重要的作用, OGD/R 引发脑神经元细胞氧化系统失衡, 进而诱导炎症反应和神经元细胞凋亡^[11]。本研究中, OGD/R 诱导的神经元细胞 ROS 荧光强度、MDA、IL-6、TNF- α 水平升高, SOD、IL-10 水平降低, 表明 OGD/R 会造成神经元细胞发生氧化应激和炎症反应, 最终造成神经元细胞损伤甚至死亡。神经元细胞凋亡是 HIE 最重要的病理生理学表现, 细胞凋亡相关蛋白的异常表达被认为是细胞死亡的标志物^[12]。本研究中, OGD/R 诱导的神经元细胞 Bax、C-caspase-3 蛋白水平升高, Bcl-2 蛋白水平降低, 表明 OGD/R 会促进神经元细胞凋亡。TAO 等^[13]发现, AMP 能保护小鼠海马神经元 HT22 细胞免受 OGD/R 诱导的氧化应激和细胞凋亡。同时, XIE 等^[14]发现, AMP 能抑制 OGD/R 诱导的 HT22 细胞凋亡, 降低脂质 ROS 活性和铁的水平。本研究结果显示, AMP 可降低 OGD/R 处理导致的神经元细胞 ROS 荧光强度、MDA、IL-6、TNF- α 及 Bax、C-caspase-3 蛋白水平, 升高 SOD、IL-10 和 Bcl-2 蛋白水平, 表明 AMP 对 OGD/R 处理导致的氧化应激、炎症和凋亡蛋白的表达有抑制作用。

JAK2/STAT3 途径是一种调节基因表达和细胞活力的信号转导途径, 具有调节细胞死亡和凋亡、抑制神经炎症和改善氧化应激的功能^[15]。JAK2/STAT3 信号通路表达主要通过 JAK2 蛋白活化激活 STAT3, 进而磷酸化 STAT3, 从而发挥一系列生物作用^[16]。ZHU 等^[5]发现, JAK2/STAT3 信号通路与缺

血性脑损伤关系密切,负调节 JAK2/STAT3 途径可减轻缺血性损伤,减少 OGD/R 诱导的 HT22 细胞凋亡并促进细胞存活。此外,ZHU 等^[17]发现,JAK/STAT 途径抑制剂可通过抑制 JAK2/STAT3 通路减少 NLRP3 炎小体激活,改善缺血性卒中损伤和神经炎症。本研究结果显示,OGD/R 诱导的神经元细胞 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 蛋白水平升高,与上述研究结果一致,表明 OGD/R 可能促进神经元细胞 JAK2、STAT3 蛋白的磷酸化激活,促进炎症和氧化应激的发生。AMP 已被证实通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路诱导骨肉瘤细胞凋亡,以及抑制脂多糖诱导的炎症反应^[18-19]。本研究中,AMP 可明显降低 OGD/R 诱导的神经元中 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 蛋白水平升高。而 AMP 高剂量加 JAK2/STAT3 激活剂干预后神经元细胞活力、SOD、IL-10、Bcl-2 蛋白水平下降,LDH 活性、细胞凋亡率、ROS 荧光强度、MDA、IL-6、TNF- α 、Bax、C-caspase-3、p-JAK2、p-STAT3 蛋白水平升高,表明 AMP 可能通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路来减轻 OGD/R 诱导的神经元细胞损伤。

综上所述,AMP 能通过减少氧化应激和炎症反应来减轻 OGD/R 诱导的神经元细胞损伤,其作用机制可能与抑制 JAK2/STAT3 信号通路磷酸化有关。本研究为治疗 OGD/R 诱导的神经元损伤提供了新思路,为治疗 HIE 患儿提供了新方法,但 AMP 对 HIE 神经元细胞损伤的保护作用的具体分子机制仍有待阐明。

参考文献

- [1] YANG L, ZHAO H, CUI H. Treatment and new progress of neonatal hypoxic-ischemic brain damage[J]. *Histol Histopathol*, 2020, 35(9): 929-936.
- [2] ZHOU Y, WANG S, ZHAO J, et al. Asiaticoside attenuates neonatal hypoxic-ischemic brain damage through inhibiting TLR4/NF- κ B/STAT3 pathway[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(10): 641-651.
- [3] WASAN H, SINGH D, JOSHI B, et al. Dihydromyricetin alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by attenuating apoptosis and astrogliosis in peri-infarct cortex[J]. *Neurol Res*, 2022, 44(5): 403-414.
- [4] 李娜,曹翔. 二氢杨梅素减轻氧糖剥夺/再灌注所致的神经元氧化应激损伤及机制[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2020, 37(10): 868-871.
- [5] ZHU J, ZHU Z, REN Y, et al. LINGO-1 shRNA protects the brain against ischemia/reperfusion injury by inhibiting the activation of NF- κ B and JAK2/STAT3 [J]. *Hum Cell*, 2021, 34(4): 1114-1122.
- [6] XIA T, GU Y, SHEN J, et al. Limonin ameliorates acute pancreatitis by suppressing JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36(12): 2392-2403.
- [7] 巨虎,刘川川,王虎,等. 岩藻多糖调节 JAK2/STAT3 信号通路保护神经元免受缺氧缺糖/再灌注损伤[J]. *中国高原医学与生物学杂志*, 2022, 43(1): 7-17.
- [8] 周厚勤,朱登纳,赵晶,等. HDAC9 沉默抑制新生大鼠海马神经元氧糖剥夺/再灌注损伤[J]. *神经解剖学杂志*, 2018, 34(4): 519-526.
- [9] GRECO P, NENCINI G, PIVA I, et al. Pathophysiology of hypoxic-ischemic encephalopathy: a review of the past and a view on the future[J]. *Acta Neurol Belg*, 2020, 120(2): 277-288.
- [10] WANG Y, LV W, LI Y, et al. Ampelopsin improves cognitive impairment in Alzheimer's disease and effects of inflammatory cytokines and oxidative stress in the hippocampus[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2020, 17(1): 44-51.
- [11] WANG R, WEI Y, DENG W, et al. Pratensein mitigates oxidative stress and NLRP3 inflammasome activation in OGD/R-injured HT22 cells by activating Nrf2-Anti-oxidant signaling[J]. *Neurotox Res*, 2022, 40(2): 384-394.
- [12] HOU Y, WANG K, WAN W, et al. Resveratrol provides neuroprotection by regulating the JAK2/STAT3/PI3K/AKT/mTOR pathway after stroke in rats[J]. *Genes Dis*, 2018, 5(3): 245-255.
- [13] TAO X, JIANG Y, ZHENG X, et al. Dihydromyricetin ameliorates oxygen-glucose deprivation and re-oxygenation-induced injury in HT22 cells by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2022, 25(3): 103-111.
- [14] XIE J, ZHANG T, LI P, et al. Dihydromyricetin attenuates cerebral ischemia reperfusion injury by inhibiting SPHK1/mTOR signaling and targeting ferroptosis[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16(1): 3071-3085.
- [15] WANG Y, KONG X Q, WU F, et al. SOCS1/JAK2/STAT3 axis regulates early brain injury induced by subarachnoid hemorrhage via inflammatory responses[J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(12): 2453-2464.
- [16] WANG X, DAI C, YIN Y, et al. Blocking the JAK2/STAT3 and ERK pathways suppresses the proliferation of gastrointestinal cancers by inducing apoptosis[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2021, 22(6): 492-503.
- [17] ZHU H, JIAN Z, ZHONG Y, et al. Janus kinase inhibition ameliorates ischemic stroke injury and neuroinflammation through reducing NLRP3 inflammasome activation via JAK2/STAT3 pathway inhibition[J]. *Front Immunol*, 2021, 12(1): 714943.
- [18] 吴倩,江波. JAK2/STAT3 信号对二氢杨梅素诱导骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡及其迁移的影响[J]. *广东药科大学学报*, 2019, 35(1): 132-136.
- [19] WENG L, ZHANG H, LI X, et al. Ampelopsin attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response through the inhibition of the NF- κ B and JAK2/STAT3 signaling pathways in microglia[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 44(1): 1-8.