

# 核因子 E2 相关因子 2 信号转导通路激活对氧糖剥夺星形胶质细胞的保护作用及其机制研究

高雨田 王克健 吴成吉 黄作义

**【摘要】** 目的 探讨核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 信号转导通路激动剂特丁基对苯二酚 (tBHQ) 对氧糖剥夺星形胶质细胞的保护作用及其作用机制。方法 将常规培养的 CTX-TNA2 大鼠脑 I 型星形胶质细胞系分为对照组、氧糖剥夺组和 tBHQ 组, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖活性, 酶标仪检测细胞氧化水平 [超氧化物歧化酶 (SOD) 活性及丙二醛 (MDA) 含量], 实时荧光定量聚合酶链反应测定细胞焦亡相关基因 *Caspase-1*、*NLRP3*、*IL-1 $\beta$* 、*IL-18* 及抗氧化相关基因 *HO-1*、*NQO1* 的相对表达量。结果 上述不同处理组星形胶质细胞增殖活性 ( $F = 8.676, P = 0.003$ ), SOD 活性 ( $F = 5.818, P = 0.013$ ) 和 MDA 含量 ( $F = 9.049, P = 0.004$ ), 细胞焦亡相关基因 *Caspase-1* ( $F = 17.926, P = 0.003$ )、*NLRP3* ( $F = 10.164, P = 0.012$ )、*IL-1 $\beta$*  ( $F = 13.472, P = 0.006$ )、*IL-18* ( $F = 8.292, P = 0.019$ ) 及抗氧化相关基因 *HO-1* ( $F = 30.468, P = 0.001$ )、*NQO1* ( $F = 29.621, P = 0.001$ ) 相对表达量差异具有统计学意义, 两两比较发现, 氧糖剥夺后星形胶质细胞增殖活性降低 ( $t = 4.114, P = 0.001$ ), SOD 活性降低 ( $t = 2.149, P = 0.029$ ), MDA 含量升高 ( $t = -2.852, P = 0.015$ ), 细胞焦亡相关基因 *Caspase-1* ( $t = -3.759, P = 0.009$ )、*NLRP3* ( $t = -4.119, P = 0.006$ )、*IL-1 $\beta$*  ( $t = -4.747, P = 0.003$ )、*IL-18* ( $t = -3.122, P = 0.021$ ) 相对表达量升高, 抗氧化相关基因 *HO-1* ( $t = 3.816, P = 0.009$ )、*NQO1* ( $t = 5.303, P = 0.002$ ) 相对表达量降低; 经 tBHQ 干预后, 星形胶质细胞增殖活性升高 ( $t = 2.621, P = 0.019$ ), SOD 活性增加 ( $t = 3.292, P = 0.005$ ), MDA 含量降低 ( $t = -4.160, P = 0.001$ ), *Caspase-1* ( $t = -5.916, P = 0.001$ )、*NLRP3* ( $t = -3.647, P = 0.011$ )、*IL-1 $\beta$*  ( $t = -4.193, P = 0.006$ )、*IL-18* ( $t = -3.825, P = 0.009$ ) 相对表达量降低, *HO-1* ( $t = 7.805, P = 0.000$ )、*NQO1* ( $t = 7.483, P = 0.000$ ) 相对表达量升高。结论 氧糖剥夺可抑制抗氧化相关基因 *HO-1* 和 *NQO1* 表达, 促进星形胶质细胞焦亡及氧化水平, 进而抑制细胞增殖活性; Nrf2 通路激动剂 tBHQ 则可促进 *HO-1* 和 *NQO1* 基因表达, 提高氧糖剥夺星形胶质细胞抗氧化水平, 逆转星形胶质细胞焦亡, 对细胞具有保护作用。

**【关键词】** 缺血性卒中; 细胞低氧; 葡萄糖; 星形细胞; NF-E2 相关因子 2; 细胞增殖; 细胞焦亡; 细胞, 培养的

## Protection and mechanism of oxygen glucose deprivation exposed astrocytes by nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 signal pathway activation

GAO Yu-tian, WANG Ke-jian, WU Cheng-ji, HUANG Zuo-yi

Department of Neurology, The First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154002, Heilongjiang, China

Corresponding author: HUANG Zuo-yi (Email: huangzuoyi\_jms@163.com)

**【Abstract】 Objective** To analyze the protective effect and mechanism of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) signal pathway agonist tertiary butylhydroquinone (tBHQ) on astrocytes under oxygen glucose deprivation (OGD). **Methods** Astrocytes were divided into 3 groups: the control group, the OGD

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2025.05.012

基金项目: 黑龙江省教育厅基本科研业务费人才培养项目 (项目编号: 2022-KYYWF-0623)

作者单位: 154002 佳木斯大学附属第一医院神经内科

通讯作者: 黄作义, Email: huangzuoyi\_jms@163.com

group, and the tBHQ group. The cell proliferation activity after OGD and tBHQ intervention was assessed using the CCK-8 assay. Oxidative stress levels were evaluated by measuring superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content. The relative expression levels of pyroptosis-related genes (*Caspase-1*, *NLRP3*, *IL-1 $\beta$* , *IL-18*) and antioxidant-related genes (*HO-1*, *NQO1*) were detected using real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR). **Results** Significant differences were observed among different treatment groups in cell proliferation activity ( $F = 8.676$ ,  $P = 0.003$ ), SOD activity ( $F = 5.818$ ,  $P = 0.013$ ), MDA content ( $F = 9.049$ ,  $P = 0.004$ ), relative expression of pyroptosis-related genes *Caspase-1* ( $F = 17.926$ ,  $P = 0.003$ ), *NLRP3* ( $F = 10.164$ ,  $P = 0.012$ ), *IL-1 $\beta$*  ( $F = 13.472$ ,  $P = 0.006$ ), *IL-18* ( $F = 8.292$ ,  $P = 0.019$ ), and antioxidant-related genes *HO-1* ( $F = 30.468$ ,  $P = 0.001$ ), *NQO1* ( $F = 29.621$ ,  $P = 0.001$ ). Compared with the control group, the OGD group exhibited reduced cell proliferation activity ( $t = 4.114$ ,  $P = 0.001$ ) and SOD activity ( $t = 2.149$ ,  $P = 0.029$ ), increased MDA content ( $t = -2.852$ ,  $P = 0.015$ ), upregulated expression of pyroptosis-related genes *Caspase-1* ( $t = -3.759$ ,  $P = 0.009$ ), *NLRP3* ( $t = -4.119$ ,  $P = 0.006$ ), *IL-1 $\beta$*  ( $t = -4.747$ ,  $P = 0.003$ ) and *IL-18* ( $t = -3.122$ ,  $P = 0.021$ ), and downregulated expression of antioxidant-related genes *HO-1* ( $t = 3.816$ ,  $P = 0.009$ ) and *NQO1* ( $t = 5.303$ ,  $P = 0.002$ ). Following tBHQ intervention, cell proliferation activity increased ( $t = 2.621$ ,  $P = 0.019$ ), SOD activity increased ( $t = 3.292$ ,  $P = 0.005$ ), MDA content decreased ( $t = -4.160$ ,  $P = 0.001$ ), expression of *Caspase-1* ( $t = -5.916$ ,  $P = 0.001$ ), *NLRP3* ( $t = -3.647$ ,  $P = 0.011$ ), *IL-1 $\beta$*  ( $t = -4.193$ ,  $P = 0.006$ ) and *IL-18* ( $t = -3.825$ ,  $P = 0.009$ ) decreased, and expression of *HO-1* ( $t = 7.805$ ,  $P = 0.000$ ) and *NQO1* ( $t = 7.483$ ,  $P = 0.000$ ) increased. **Conclusions** OGD can suppress the expression of antioxidant-related genes *HO-1* and *NQO1*, promote astrocytes pyroptosis and oxidative stress, and inhibit cell proliferation activity. Nrf2 signal pathway agonist tBHQ can enhance the expression of *HO-1* and *NQO1*, reduce oxidative stress in OGD-exposed astrocytes, reverse pyroptosis, and exert protective effects on the cells.

**【Key words】** Ischemic stroke; Cell hypoxia; Glucose; Astrocytes; NF-E2-related factor 2; Cell proliferation; Pyroptosis; Cells, cultured

This study was supported by Project for Talent Cultivation Under the Basic Scientific Research Business Expenses of the Provincial Department of Education in Heilongjiang Province (No. 2022-KYYWF-0623).

**Conflicts of interest:** none declared

缺血性卒中给患者、家庭及社会造成沉重经济负担<sup>[1-3]</sup>,因此,有效预防和治疗意义重大。缺血性卒中发生后出现神经细胞缺血、缺氧,导致局部脑组织供氧不足,激活炎性细胞,诱发氧化应激反应,导致神经细胞死亡<sup>[4-5]</sup>。星形胶质细胞是中枢神经系统的胶质细胞,通过抗氧化、细胞吞噬和炎症调节等途径参与维持中枢神经系统稳态以及保护神经元免受氧化应激损伤。细胞焦亡(pyroptosis)是一种细胞死亡方式,可发生于缺血性卒中不同阶段。缺血性卒中亦损伤星形胶质细胞,但缺血性卒中发生后星形胶质细胞与细胞焦亡的关系目前尚不清楚。核因子E2相关因子2(Nrf2)信号转导通路具有重要的抗氧化防御作用,可调节抗氧化基因的表达<sup>[6]</sup>。本研究构建星形胶质细胞氧糖剥夺(OGD)模型并予以Nrf2通路激动剂特丁基对苯二酚(tBHQ),探讨氧糖剥夺和Nrf2通路激活对星形胶质细胞氧化应激和细胞焦亡的影响及其作用机制,以为阐明缺血性卒中氧化应激反应机制和制定临床治疗方案提供理论依据。

## 材料与方法

### 一、实验材料

1. 细胞来源 CTX-TNA2大鼠脑I型星形胶质细胞系购自美国ATCC公司,常规保存于液氮。实验开始前复苏,以含体积分数为10%胎牛血清(FBS)和体积分数为1%青霉素-链霉素双抗溶液的DMEM高糖培养基置于37℃、含5%二氧化碳(CO<sub>2</sub>)的恒温培养箱中培养,每3天更换培养液,7d后进行传代培养。

2. 试剂与仪器 (1)药品与试剂:含体积分数为10%胎牛血清和体积分数为1%青霉素-链霉素的双抗溶液购自上海碧云天生物技术有限公司,DMEM高糖培养基、CCK-8检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒和DEPC水均购自生工生物工程(上海)股份有限公司,DMEM无糖培养基购自美国Gibco公司,Nrf2通路激动剂tBHQ(100 mg)购自美国Selleck Chemicals公司,TRIzol试剂购自美国Thermo Fisher Scientific

公司,异丙醇和无水乙醇购自天津市凯通化学试剂有限公司,逆转录试剂盒(PrimeScript™ RT Master Mix)及扩增试剂盒(SYBR® Premix Ex Taq™ II)购自日本Takara Bio株式会社。(2)仪器与设备:含5% CO<sub>2</sub>的恒温培养箱购自美国Thermo Fisher Scientific公司,厌氧密封培养罐(内置厌氧产气袋)购自日本三菱商事株式会社,-80℃超低温冰箱和-20℃低温冰箱购自海尔智家股份有限公司,超净台购自苏州净化设备有限公司,实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(LightCycler 96)购自瑞士Roche公司,Synergy H1多功能酶标仪(精密度1 nm)购自美国BioTek公司,NanoDrop分光光度计购自美国Thermo Fisher Scientific公司。

## 二、实验方法

1. 细胞分组与模型制备 将常规培养的星形胶质细胞分为对照组、氧糖剥夺组和tBHQ组,参照文献[7]方法,对照组常规培养;氧糖剥夺组更换为DMEM无糖培养基,置于厌氧密封培养罐,于37℃恒温培养箱培养6 h,制备氧糖剥夺模型;tBHQ组更换为DMEM无糖培养基,并加入40 μmol/L tBHQ,置于厌氧密封培养罐,于37℃恒温培养箱培养6 h。

2. CCK-8法检测星形胶质细胞的增殖活性 将生长良好、处于对数生长期的星形胶质细胞接种于96孔板(每组6个复孔,每孔细胞数约 $2 \times 10^3$ 个),同时设置不含细胞的空白对照孔。细胞培养24 h待贴壁后,按照上述细胞分组方法进行模型制备和干预;再向各孔加入10 μl CCK-8试剂,于37℃恒温培养箱孵育1 h,采用多功能酶标仪测定450 nm波长处光密度(OD)值。以实验孔OD值与空白对照孔OD值的差值代表细胞增殖活性。

3. 星形胶质细胞氧化水平测定 各组细胞接种于10 cm培养皿,干预后胰酶消化,于1000×g离心5 min,弃上清液,收集于EP管(每组1个EP管),加入细胞提取液1 ml/ $5 \times 10^6$ 个细胞,超声波破碎细胞,于4℃、8000×g离心10 min,取上清液。按照说明书在96孔板依次加入样品及试剂,每组设置5个复孔及2个空白对照孔;37℃水浴30 min,多功能酶标仪测定560 nm波长处OD值,计算SOD活性,测定532和600 nm波长处OD值,计算MDA含量。

4. 实时荧光定量聚合酶链反应测定焦亡相关基因和抗氧化相关基因的相对表达量 将每组细胞与1 ml TRIzol试剂混合,后加入0.20 ml氯仿振荡15 s,于4℃、12 000×g离心15 min,取上清液,提取

细胞总RNA。加入0.50 ml异丙醇沉淀RNA,经1 ml体积分数为75%乙醇洗涤,20 μl DEPC水溶解,采用NanoDrop分光光度计测定RNA浓度。按照逆转录试剂盒说明书逆转录样本总RNA,合成cDNA后按照嵌合荧光法扩增试剂盒说明书进行实时荧光定量PCR检测,所用基因引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。*HO-1*基因正向引物序列为5'-GGGTCCTCACACTCAGTTTC-3'、反向引物序列为5'-CCAGGCATCTCCTTCCATTC-3',*NQO1*基因正向引物序列为5'-ATTGTATTGGCCCACGCAGA-3'、反向引物序列为5'-GATTCGACCACCTCCCATCC-3',*Caspase-1*基因正向引物序列为5'-AAACACCCACTCGTACACGTCTTG-3'、反向引物序列为5'-AGGTCAACATCAGCTCCGACTCTC-3',*NLRP3*基因正向引物序列为5'-GAGCTGGACCTCAGTGACAATGC-3'、反向引物序列为5'-AGAACCAATGCGAGATCCTGACAAC-3',*IL-1β*基因正向引物序列为5'-AATCTCACAGCAGCATCTCGACAAG-3'、反向引物序列为5'-TCCACGGGCAAGACATAGGTAGC-3',*IL-18*基因正向引物序列为5'-CGACCGAACAGCCAACGAATCC-3'、反向引物序列为5'-GTCACAGCCAGTCCTCTTACTTCAC-3'。内参照物β-肌动蛋白(β-actin)正向引物序列为5'-GTCCGGTGTGAACGGATTTG-3'、反向引物序列5'-TCCCATTCTCAGCCTTGAC-3'。采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算焦亡相关基因和抗氧化相关基因相对表达量。

5. 统计分析方法 采用SPSS 29.0统计软件进行数据处理与分析。呈正态分布的计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析,两两比较行LSD-*t*检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 结 果

CCK-8法显示,不同处理组星形胶质细胞增殖活性差异具有统计学意义( $P=0.003$ ,表1),其中,氧糖剥夺组细胞增殖活性低于对照组( $P=0.001$ )和tBHQ组( $P=0.019$ ),而对照组与tBHQ组差异无统计学意义( $P=0.156$ ,表2),提示氧糖剥夺可抑制星形胶质细胞的增殖活性,Nrf2通路激动剂tBHQ则可提高氧糖剥夺后星形胶质细胞的增殖活性。

星形胶质细胞氧化水平测定显示,不同处理组

**表 1** 不同处理组星形胶质细胞增殖活性的比较 ( $\bar{x} \pm s, OD_{450\text{nm}}$ )

**Table 1.** Comparison of proliferation activity of astrocytes among different treatment groups ( $\bar{x} \pm s, OD_{450\text{nm}}$ )

组别	样本数	细胞增殖活性	F 值	P 值
对照组	6	1.189 ± 0.058		
氧糖剥夺组	6	1.079 ± 0.043	8.676	0.003
tBHQ 组	6	1.149 ± 0.036		

tBHQ, tertiary butylhydroquinone, 特丁基对苯二酚。The same for Table 2

**表 2** 不同处理组星形胶质细胞增殖活性的两两比较

**Table 2.** Pairwise comparison of proliferation activity of astrocytes among different treatment groups

组间两两比	t 值	P 值
对照组 : 氧糖剥夺组	4.114	0.001
对照组 : tBHQ 组	1.494	0.156
氧糖剥夺组 : tBHQ 组	2.621	0.019

**表 3** 不同处理组星形胶质细胞 SOD 活性及 MDA 含量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 3.** Comparison of SOD activity and MDA content of astrocytes among different treatment groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	SOD (U/10 × 10 <sup>3</sup> 个细胞)	MDA (nmol/10 × 10 <sup>3</sup> 个细胞)
对照组	5	0.142 ± 0.014	0.028 ± 0.002
氧糖剥夺组	5	0.118 ± 0.010	0.031 ± 0.001
tBHQ 组	5	0.151 ± 0.025	0.027 ± 0.001
F 值		5.818	9.049
P 值		0.013	0.004

tBHQ, tertiary butylhydroquinone, 特丁基对苯二酚; SOD, superoxide dismutase, 超氧化物歧化酶; MDA, malondialdehyde, 丙二醛。The same for Table 4

**表 4** 不同处理组星形胶质细胞 SOD 活性及 MDA 含量的两两比较

**Table 4.** Pairwise comparison of SOD activity and MDA content of astrocytes among different treatment groups

组间两两比	SOD		MDA	
	t 值	P 值	t 值	P 值
对照组 : 氧糖剥夺组	2.149	0.029	-2.852	0.015
对照组 : tBHQ 组	-0.874	0.396	1.307	0.216
氧糖剥夺组 : tBHQ 组	3.292	0.005	-4.160	0.001

星形胶质细胞 SOD 活性 ( $P = 0.013$ ) 及 MDA 含量 ( $P = 0.004$ ) 差异具有统计学意义 (表 3), 其中, 氧糖剥夺组 SOD 活性低于对照组 ( $P = 0.029$ ) 和 tBHQ 组 ( $P = 0.005$ ), MDA 含量高于对照组 ( $P = 0.015$ ) 和 tBHQ 组 ( $P = 0.001$ ), 而对照组与 tBHQ 组 SOD 活性 ( $P = 0.396$ ) 和 MDA 含量 ( $P = 0.216$ ) 差异无统计学意义

(表 4), 提示氧糖剥夺可降低星形胶质细胞抗氧化水平, Nrf2 通路激动剂 tBHQ 则可提高氧糖剥夺后星形胶质细胞抗氧化水平, 对细胞具有保护作用。

实时荧光定量 PCR 法显示, 不同处理组星形胶质细胞焦亡相关基因 *Caspase-1* ( $P = 0.003$ )、*NLRP3* ( $P = 0.012$ )、*IL-1 $\beta$*  ( $P = 0.006$ ) 和 *IL-18* ( $P = 0.019$ ) 相对表达量差异有统计学意义 (表 5), 其中, 氧糖剥夺组 *Caspase-1*、*NLRP3*、*IL-1 $\beta$* 、*IL-18* 相对表达量均高于对照组 ( $P = 0.009, 0.006, 0.003, 0.021$ ) 和 tBHQ 组 ( $P = 0.001, 0.011, 0.006, 0.009$ ), 对照组与 tBHQ 组差异无统计学意义 ( $P = 0.074, 0.645, 0.600, 0.508$ ; 表 6), 提示氧糖剥夺可促进星形胶质细胞焦亡, Nrf2 通路激动剂 tBHQ 则可逆转氧糖剥夺对星形胶质细胞的焦亡作用。为进一步分析 Nrf2 通路激动剂 tBHQ 对氧糖剥夺后星形胶质细胞氧化损伤的调节机制, 本研究采用实时荧光定量 PCR 法检测抗氧化相关基因的相对表达量, 结果显示, 不同处理组星形胶质细胞抗氧化相关基因 *HO-1* ( $P = 0.001$ ) 和 *NQO1* ( $P = 0.001$ ) 相对表达量差异具有统计学意义 (表 7), 其中, 氧糖剥夺组 *HO-1* 和 *NQO1* 相对表达量低于对照组 ( $P = 0.009, 0.002$ ) 和 tBHQ 组 ( $P = 0.000, 0.000$ ), tBHQ 组 *HO-1* 相对表达量高于对照组 ( $P = 0.007$ , 表 8), 提示氧糖剥夺可抑制星形胶质细胞抗氧化相关基因 *HO-1* 及 *NQO1* 的表达, Nrf2 通路激动剂 tBHQ 则可逆转氧糖剥夺对星形胶质细胞抗氧化相关基因的影响。

## 讨 论

氧化应激在缺血性卒中后神经损伤过程中发挥重要作用。缺氧、缺血状态下生成大量氧自由基, 与细胞内结构物质如蛋白质、脂质、核酸等反应, 导致细胞结构和功能损害; 同时导致神经炎症反应持续进展和加剧, 消耗自然抗氧化防御系统抗氧化成分如 SOD、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 等, 加剧氧化应激损伤, 促进细胞死亡<sup>[8]</sup>。细胞焦亡被视为位于细胞凋亡与坏死之间的细胞死亡模式, 常因氧化应激等刺激或损伤触发炎症反应而启动。发生细胞焦亡时, 细胞膜破裂或受损, 引发内外环境失衡, 焦亡细胞释放包括细胞内物质、细胞组成成分及活性分子在内的诸多炎性介质, 引发炎症反应并损伤邻近细胞, 加剧细胞死亡。特别是缺血性卒中发病机制中细胞焦亡发挥至关重要的作用, 缺

**表 5** 不同处理组星形胶质细胞焦亡相关基因相对表达量的比较( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 5.** Comparison of pyroptosis-related genes expression of astrocytes in different treatment groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	<i>Caspase-1</i>	<i>NLRP3</i>	<i>IL-1<math>\beta</math></i>	<i>IL-18</i>
对照组	3	1.000 $\pm$ 0.054	1.000 $\pm$ 0.022	1.000 $\pm$ 0.055	1.000 $\pm$ 0.110
氧糖剥夺组	3	1.188 $\pm$ 0.082	1.144 $\pm$ 0.044	1.178 $\pm$ 0.033	1.244 $\pm$ 0.062
tBHQ 组	3	0.893 $\pm$ 0.038	1.017 $\pm$ 0.055	1.022 $\pm$ 0.047	0.949 $\pm$ 0.103
<i>F</i> 值		17.926	10.164	13.472	8.292
<i>P</i> 值		0.003	0.012	0.006	0.019

tBHQ, tertiary butylhydroquinone, 特丁基对苯二酚。The same for tables below

**表 6** 不同处理组星形胶质细胞焦亡相关基因相对表达量的两两比较

**Table 6.** Pairwise comparison of pyroptosis-related genes expression of astrocytes in different treatment groups

组间两两比	<i>Caspase-1</i>		<i>NLRP3</i>		<i>IL-1<math>\beta</math></i>		<i>IL-18</i>	
	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
对照组: 氧糖剥夺组	-3.759	0.009	-4.119	0.006	-4.747	0.003	-3.122	0.021
对照组: tBHQ 组	2.157	0.074	-0.472	0.645	-0.554	0.600	0.703	0.508
氧糖剥夺组: tBHQ 组	-5.916	0.001	-3.647	0.011	-4.193	0.006	-3.825	0.009

**表 7** 不同处理组星形胶质细胞抗氧化相关基因相对表达量的比较( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 7.** Comparison of antioxidant-related genes expression of astrocytes in different treatment groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	<i>HO-1</i>	<i>NQO1</i>
对照组	3	1.000 $\pm$ 0.025	1.000 $\pm$ 0.024
氧糖剥夺组	3	0.828 $\pm$ 0.042	0.824 $\pm$ 0.049
tBHQ 组	3	1.179 $\pm$ 0.082	1.072 $\pm$ 0.045
<i>F</i> 值		30.468	29.621
<i>P</i> 值		0.001	0.001

**表 8** 不同处理组星形胶质细胞抗氧化相关基因相对表达量的两两比较

**Table 8.** Pairwise comparison of the antioxidant-related genes expression of astrocytes in the different treatment groups

组间两两比	<i>HO-1</i>		<i>NQO1</i>	
	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
对照组: 氧糖剥夺组	3.816	0.009	5.303	0.002
对照组: tBHQ 组	-3.990	0.007	-2.180	0.072
氧糖剥夺组: tBHQ 组	7.805	0.000	7.483	0.000

血性卒中后缺氧增加氧自由基及氧化物质的产生, 激活氧化应激反应, 过度的氧化应激可引起细胞内部氧化损伤和线粒体损伤, 造成 ATP 水平急剧下降, 细胞无法维持正常能量代谢, 引起能量耗尽, 最终触发细胞焦亡。

星形胶质细胞是中枢神经系统最常见的神经胶质细胞, 是脑组织的主要支持细胞, 对维持大脑结构和功能稳定具有重要意义, 在缺血性卒中发病机制中亦发挥重要作用<sup>[9]</sup>。缺血性卒中引发的炎症反应中, 星形胶质细胞参与释放炎性介质以及免疫细胞招募和活化, 影响缺血性卒中后炎症反应进展和神经功能恢复<sup>[10]</sup>。研究显示, 星形胶质细胞在缺血性卒中发病过程中与氧化应激反应密切相关, 缺血性卒中引起的缺血、缺氧可促使神经细胞发生氧化应激反应, 以及星形胶质细胞释放氧自由基、过氧化物等, 进一步加剧氧化应激<sup>[11]</sup>。本研究结果显示, 氧糖剥夺使星形胶质细胞增殖活性降低, SOD 活性降

低, MDA 含量升高。SOD 是超氧化物阴离子清除酶, 在生物抗氧化系统中发挥重要作用; MDA 是氧自由基作用于脂质生成过氧化脂质的分解产物, 其含量升高代表细胞内氧自由基含量升高。本研究结果还显示, 氧糖剥夺使细胞焦亡相关基因水平升高, 细胞抗氧化相关基因水平降低。细胞焦亡是炎症小体引发的一种细胞裂解程序死亡模式, 伴强烈的炎症反应, 经典通路包括核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体活化、Caspase-1 参与, 以及白细胞介素-1 $\beta$  和 18 (IL-1 $\beta$  和 IL-18) 炎性因子产生。本研究结果提示, 氧化应激和细胞焦亡是氧糖剥夺损伤星形胶质细胞的潜在机制。

Nrf2 通路是一种内源性抗氧化通路, 通过与抗氧化反应元件 (ARE) 结合调节抗氧化酶的分泌, 发挥抗氧化作用<sup>[6]</sup>。研究显示, Nrf2 通路通过上调各种清除蛋白 (包括抗氧化、抗炎和解毒酶) 的表达, 参与氧化应激条件下损伤部位氧化物质的清除过

程<sup>[8]</sup>。本研究采用Nrf2通路激动剂tBHQ干预氧糖剥夺星形胶质细胞,结果显示,经tBHQ干预后,星形胶质细胞增殖活性增强,SOD活性升高,MDA含量降低,表明tBHQ可增强氧糖剥夺星形胶质细胞的增殖活性,提高抗氧化水平,对细胞具有保护作用;同时,tBHQ下调细胞焦亡相关基因*Caspase-1*、*NLRP3*、*IL-1 $\beta$* 及*IL-18*表达,说明tBHQ可抑制氧糖剥夺星形胶质细胞焦亡;为进一步探究tBHQ对氧糖剥夺星形胶质细胞氧化应激及焦亡的调控机制,发现tBHQ可逆转氧糖剥夺星形胶质细胞对抗氧化相关基因表达的影响,提示调节抗氧化相关基因*HO-1*及*NQO1*的表达是tBHQ调控氧糖剥夺星形胶质细胞氧化应激及焦亡的潜在机制。

当细胞受到氧化应激或其他刺激时,Nrf2通路可脱离细胞质内Keap1的控制进入细胞核并与ARE结合,促进一系列抗氧化基因的转录<sup>[12]</sup>。*HO-1*基因是Nrf2通路重要目标基因之一,Nrf2通路与*HO-1*调控区域相结合,通过直接作用于*HO-1*启动子区,促进其转录,表明Nrf2通路可直接操纵HO-1蛋白的生成。作为一种关键的抗氧化酶,HO-1蛋白分解血红蛋白并生成一氧化碳(CO)、胆红素及铁等代谢产物,显示出显著的抗氧化和抗炎效果。HO-1蛋白可以调控凋亡相关蛋白的表达,如Bcl-2家族蛋白、Caspase等,抑制凋亡信号转导通路的激活,发挥抗凋亡作用;此外,HO-1蛋白产生的CO还可影响线粒体功能,抑制线粒体介导的细胞死亡<sup>[13]</sup>。上述研究结果揭示Nrf2通路通过促进*HO-1*基因表达,提高抗氧化机制,有助于抑制细胞焦亡。*NQO1*基因亦为Nrf2通路的目标基因,在抗氧化机制中发挥至关重要作用。*NQO1*基因负责编码一种具备抗氧化作用的酶,参与调节细胞内氧化还原平衡;可还原细胞内多种氧化物如喹啉类化合物,有助于消除氧化物,减轻氧化应激,防止氧化损伤;还可通过Caspase参与调节细胞凋亡。Caspase是执行细胞凋亡的核心酶,参与传递和执行凋亡信号<sup>[14-16]</sup>。*NQO1*基因表达变化受Nrf2通路的精确调控,Nrf2通路激活并进入细胞核后,与*NQO1*调控区相结合,促进*NQO1*转录,并增加NQO1蛋白合成,以提高细胞抗氧化能力<sup>[17-19]</sup>。本研究结果显示,Nrf2通路激动剂tBHQ通过调节*HO-1*和*NQO1*基因的表达,有效减轻氧化应激反应,有助于抑制细胞焦亡。

本研究通过构建星形胶质细胞氧糖剥夺模型,探究Nrf2通路激动剂tBHQ在减轻细胞氧化应激和

焦亡中的作用,揭示抗氧化相关基因*HO-1*和*NQO1*的关键调节作用,支持Nrf2通路在神经保护中的潜在应用价值,为缺血性卒中的抗氧化治疗提供新的思路。然而本研究为体外实验,尚待动物模型和临床研究的进一步验证。后续研究可通过构建动物模型,进一步完善缺血性卒中后Nrf2通路机制研究,为临床转化提供理论支持。

利益冲突 无

## 参 考 文 献

- [1] Dunbar M, Kirton A. Perinatal stroke[J]. Semin Pediatr Neurol, 2019, 32:100767.
- [2] Wei B, Huang J, Zhang Y, Hu X, Ma C, Li Y, Chen P. Restoration of RECK expression attenuates liver fibrosis induced by carbon tetrachloride through the Nrf2-MMP9 axis[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 143(Pt 2):113475.
- [3] Bersano A, Gatti L. Pathophysiology and treatment of stroke: present status and future perspectives[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24:14848.
- [4] Orellana - Urzúa S, Rojas I, Líbano L, Rodrigo R. Pathophysiology of ischemic stroke: role of oxidative stress[J]. Curr Pharm Des, 2020, 26:4246-4260.
- [5] Huang CY, Chiang WC, Yeh YC, Fan SC, Yang WH, Kuo HC, Li PC. Effects of virtual reality-based motor control training on inflammation, oxidative stress, neuroplasticity and upper limb motor function in patients with chronic stroke: a randomized controlled trial[J]. BMC Neurol, 2022, 22:21.
- [6] Sanghvi VR, Leibold J, Mina M, Mohan P, Berishaj M, Li Z, Miele MM, Lailier N, Zhao C, de Stanchina E, Viale A, Akkari L, Lowe SW, Ciriello G, Hendrickson RC, Wendel HG. The oncogenic action of NRF2 depends on de-glycation by fructosamine-3-kinase[J]. Cell, 2019, 178:807-819.
- [7] Li C, Fan J, Sun G, Zhao H, Zhong X, Huang X, Zhu X, Qi X. Nrf2 pathway activation promotes the expression of genes related to glutathione metabolism in alcohol-exposed astrocytes[J]. PeerJ, 2024, 12:e17541.
- [8] Wang L, Zhang X, Xiong X, Zhu H, Chen R, Zhang S, Chen G, Jian Z. Nrf2 regulates oxidative stress and its role in cerebral ischemic stroke[J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11:2377.
- [9] Patabendige A, Singh A, Jenkins S, Sen J, Chen R. Astrocyte activation in neurovascular damage and repair following ischaemic stroke[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22:4280.
- [10] Xu S, Lu J, Shao A, Zhang JH, Zhang J. Glial cells: role of the immune response in ischemic stroke[J]. Front Immunol, 2020, 11:294.
- [11] Liu H, Wu X, Luo J, Wang X, Guo H, Feng D, Zhao L, Bai H, Song M, Liu X, Guo W, Li X, Yue L, Wang B, Qu Y. Pterostilbene attenuates astrocytic inflammation and neuronal oxidative injury after ischemia-reperfusion by inhibiting NF- $\kappa$ B phosphorylation[J]. Front Immunol, 2019, 10:2408.
- [12] Hao L, Zhang A, Lv D, Cong L, Sun Z, Liu L. EGCG activates Keap1/P62/Nrf2 pathway, inhibits iron deposition and apoptosis in rats with cerebral hemorrhage[J]. Sci Rep, 2024, 14:31474.
- [13] Kim EN, Trang NM, Kang H, Kim KH, Jeong GS. Phytol suppresses osteoclast differentiation and oxidative stress through Nrf2/HO-1 regulation in RANKL-induced RAW264.7 cells[J]. Cells, 2022, 11:3596.
- [14] Feng Y, Cui R, Li Z, Zhang X, Jia Y, Zhang X, Shi J, Qu K, Liu C, Zhang J. Methane alleviates acetaminophen -

- induced liver injury by inhibiting inflammation, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis through the Nrf2/HO-1/NQO1 signaling pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019:ID7067619.
- [15] Sun YY, Zhu HJ, Zhao RY, Zhou SY, Wang MQ, Yang Y, Guo ZN. Remote ischemic conditioning attenuates oxidative stress and inflammation via the Nrf2/HO-1 pathway in MCAO mice [J]. *Redox Biol*, 2023, 66:102852.
- [16] Liu D, Wang H, Zhang Y, Zhang Z. Protective effects of chlorogenic acid on cerebral ischemia/reperfusion injury rats by regulating oxidative stress-related Nrf2 pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14:51-60.
- [17] Lu Q, Zhang Y, Zhao C, Zhang H, Pu Y, Yin L. Copper induces oxidative stress and apoptosis of hippocampal neuron via pCREB/BDNF/ and Nrf2/HO-1/NQO1 pathway [J]. *J Appl Toxicol*, 2022, 42:694-705.
- [18] Ross D, Siegel D. The diverse functionality of NQO1 and its roles in redox control [J]. *Redox Biol*, 2021, 41:101950.
- [19] Drolet J, Buchner-Duby B, Stykel MG, Coackley C, Kang JX, Ma DWL, Ryan SD. Docosahexanoic acid signals through the Nrf2-Nqo1 pathway to maintain redox balance and promote neurite outgrowth [J]. *Mol Biol Cell*, 2021, 32:511-520.

(收稿日期:2025-01-16)

(本文编辑:吴春蕊)

## · 小词典 ·

## 中英文对照名词词汇(四)

- 人工智能 artificial intelligence(AI)
- 三维时间飞跃 three-dimensional time-of-flight(3D-TOF)
- 伤残调整寿命年 disability adjusted life year(DALY)
- 深度学习 deep learning(DL)
- 神经丝蛋白轻链 neurofilament light chain(NFL)
- 神经血管单元 neurovascular unit(NVU)
- 神经影像学血管性改变报告标准  
STandards for ReportIng Vascular changes on nEuroimaging  
(STRIVE)
- 胜率比 win ratio(WR)
- 视觉模拟评分 Visual Analog Scales(VAS)
- 受试者工作特征曲线  
receiver operating characteristic curve(ROC曲线)
- 损伤相关分子模式  
damaged-associated molecular patterns(DAMP)
- 胎牛血清 fetal bovine serum(FBS)
- $\beta$ 2-糖蛋白1  $\beta$ 2-glycoprotein 1( $\beta$ 2-GP1)
- 糖化血红蛋白 glycosylated hemoglobin(HbA1c)
- 糖基磷脂酰肌醇 glycosylphosphatidylinositol(GPI)
- 糖耐量减低 impaired glucose tolerance(IGT)
- 特丁基对苯二酚 tertiary butyl hydroquinone(tBHQ)
- 特异性活动平衡信心量表  
Activities-Specific Balance Confidence Scale(ABC)
- 体重指数 body mass index(BMI)
- 同型半胱氨酸 homocysteine(Hcy)
- 晚期糖基化终末产物受体  
receptor for advanced glycation end product(RAGE)
- 微栓子信号 microembolic signals(MES)
- 无症状性颅内出血  
asymptomatic intracranial hemorrhage(asICH)
- 细胞色素 P450 cytochrome P450(CYP450)
- 细胞外基质 extracellular matrix(ECM)
- 小动脉硬化型脑小血管病  
arteriosclerotic cerebral small vessel disease(aCSVD)
- 心房利尿钠肽前体中间片段  
midregional pro-atrial natriuretic peptide(MR-proANP)
- 心源性栓塞 cardiac embolism(CE)
- B型利尿钠肽 B-type natriuretic peptide(BNP)
- 血管内皮生长因子  
vascular endothelial growth factor(VEGF)
- 血管内治疗 endovascular treatment(EVT)
- 血管生成素-2 angiotensin-2(Ang-2)
- 血管性痴呆 vascular dementia(VaD)
- 血小板衍生生长因子-CC  
platelet-derived growth factor CC(PDGF-CC)
- 氧糖剥夺 oxygen glucose deprivation(OGD)
- Toll样受体 Toll-like receptor(TLR)
- 遗传性出血性毛细血管扩张症  
hereditary hemorrhagic telangiectasia(HHT)
- 隐源性卒中 cryptogenic stroke(CS)
- 载脂蛋白B apolipoprotein B(ApoB)
- 早期神经功能恶化 early neurologic deterioration(END)
- 诊断比值比 diagnostic odds ratio(DOR)
- 振荡剪切指数 Oscillatory Shear Index(OSI)
- 症状性颅内出血  
symptomatic intracranial hemorrhage(sICH)
- 支架内再狭窄 in-stent restenosis(ISR)
- 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白  
neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL)
- 蛛网膜下腔出血 subarachnoid hemorrhage(SAH)
- 主观视觉垂直 subjective visual vertical(SVV)
- 总胆固醇 total cholesterol(TC)
- 组织蛋白酶B cathepsin B(CTSB)
- 组织型纤溶酶原激活物 tissue plasminogen activator(t-PA)