

红景天苷调节MAPK/ERK/mTOR信号通路对OGD/R诱导的海马神经元自噬和凋亡的影响

唐朝¹, 曹妍群^{2*}, 陈超亮³, 周菊香³

¹邵阳学院普爱医学院, 湖南邵阳 422000; ²邵阳学院教务处, 湖南邵阳 422000; ³邵阳市中心医院儿科, 湖南邵阳 422000

[中图分类号] R511 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.1815.2025.0528

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 唐朝, 曹妍群, 陈超亮, 等. 红景天苷调节MAPK/ERK/mTOR信号通路对OGD/R诱导的海马神经元自噬和凋亡的影响[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(8): 1008-1014.

[收稿日期] 2024-11-11 [录用日期] 2025-02-21 [上线日期] 2025-05-28

[摘要] 目的 探究红景天苷调节促分裂原活化的蛋白激酶(MAPK)/胞外信号调节激酶(ERK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路, 对氧-糖剥夺/再灌注(OGD/R)诱导的海马神经元自噬和凋亡的影响。方法 体外培养小鼠海马神经元细胞系HT22, 随机分为对照组、OGD/R组、红景天苷组、特丁基对苯二酚(TBHQ)组、红景天苷+TBHQ组; 除对照组外, 均制备OGD/R诱导的细胞模型; 相应组细胞分别采用红景天苷(500 $\mu\text{mol/L}$)和(或)MAPK激活剂TBHQ(50 $\mu\text{mol/L}$)干预24 h。测定各组细胞乳酸脱氢酶(LDH)释放率, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, MTT法检测细胞活力; 吖啶橙(AO)染色检测各组细胞自噬情况; ELISA法测定各组细胞炎症因子白细胞介素(IL)-6、IL-8、IL-17和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平; Western blotting检测各组细胞凋亡、自噬与MAPK/ERK/mTOR信号通路相关蛋白表达水平。结果 500 $\mu\text{mol/L}$ 红景天苷可明显增强OGD/R诱导的HT22细胞活力($P<0.05$), 且对正常培养的HT22细胞活力影响不明显($P>0.05$)。与对照组比较, OGD/R组细胞LDH释放率, 细胞凋亡率, 自噬体生成率, IL-6、IL-8、IL-17与TNF- α 水平, Bcl-2相关X蛋白(Bax)、活化胱天蛋白酶-3(Cleaved caspase-3)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)与Beclin-1蛋白表达, 以及微管相关蛋白1轻链3(LC3) II/LC3 I、磷酸化(p)-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2升高($P<0.05$), 细胞活力、p-mTOR/mTOR降低($P<0.05$)。与OGD/R组比较, 红景天苷组细胞LDH释放率, 细胞凋亡率, 自噬体生成率, IL-6、IL-8、IL-17、TNF- α 水平, 以及Bcl-2相关X蛋白(Bax)、Cleaved caspase-3、Caspase-3与Beclin-1蛋白表达、LC3 II/LC3 I、p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2降低($P<0.05$), 细胞活力、p-mTOR/mTOR升高($P<0.05$); TBHQ组细胞各指标变化趋势与红景天苷组相反($P<0.05$)。与红景天苷组比较, 红景天苷+TBHQ组细胞LDH释放率, 细胞凋亡率, 自噬体生成率, IL-6、IL-8、IL-17与TNF- α 水平, Bax、Cleaved caspase-3、Caspase-3与Beclin-1蛋白表达, 以及LC3 II/LC3 I、p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2升高($P<0.05$), 细胞活力、p-mTOR/mTOR降低($P<0.05$)。结论 红景天苷可能通过阻止MAPK/ERK/mTOR信号途径激活和转导, 抑制OGD/R诱导的海马神经元自噬和凋亡。

[关键词] 红景天苷; 氧-糖剥夺/再灌注; 促分裂原活化的蛋白激酶; 海马神经元; 自噬; 凋亡

Effects of salidroside on OGD/R-induced autophagy and apoptosis of hippocampal neurons by regulating the MAPK/ERK/mTOR signaling pathway

Tang Chao¹, Cao Yan-Qun^{2*}, Chen Chao-Liang³, Zhou Ju-Xiang³

¹Puai Medical College, ²Academic Affairs Office, Shaoyang University, Shaoyang, Hunan 422000, China

³Department of Pediatrics, the Central Hospital of Shaoyang, Shaoyang, Hunan 422000, China

*Corresponding author, E-mail: hupoweijdz@163.com

This work was supported by the Regional Joint Fund Project of Natural Science Foundation of Hunan (2023JJ50279)

[基金项目] 湖南省自然科学基金区域联合基金项目(2023JJ50279)

[作者简介] 唐朝, 博士研究生, 副教授, 主要从事急诊医学方面的研究

[通信作者] 曹妍群, E-mail: hupoweijdz@163.com

[Abstract] Objective To explore the effects of Rhodiola salidoside on regulating the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway and explore its impact on hippocampal neuron autophagy and apoptosis induced by oxygen-glucose deprivation/reperfusion (OGD/R). **Methods** The mouse hippocampal neuronal cell line HT22 was cultured in vitro and randomly divided into control group, OGD/R group, salidoside group, tert-butylhydroquinone (TBHQ) group, and salidoside+TBHQ group. Except for control group, cell models were established by OGD/R induction in other groups. Cells in corresponding groups were treated with Rhodiola salidoside (500 $\mu\text{mol/L}$) and/or MAPK activator TBHQ (50 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h. The lactate dehydrogenase (LDH) release rates were measured, cell apoptosis was detected by flow cytometry, and cell viability was assessed by MTT assay. Acridine orange (AO) staining was used to detect autophagy. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the expression levels of inflammatory cytokines including interleukins (IL)-6, IL-8, and IL-17, and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Western blotting was performed to detect the expression levels of proteins related to apoptosis, autophagy, and the MAPK/ERK/mTOR signaling pathway. **Results** Salidoside (500 $\mu\text{mol/L}$) significantly enhanced the viability of OGD/R-induced HT22 cells ($P < 0.05$), without obvious effect on the viability of normally cultured HT22 cells ($P > 0.05$). Compared with control group, OGD/R group showed significantly increased LDH release rates, apoptosis rates, autophagosome formation rates, levels of IL-6, IL-8, IL-17 and TNF- α , expressions of Bcl-2-associated X protein (Bax), Cleaved Caspase-3, Caspase-3 and Beclin-1 protein, ratios of microtubule-associated protein 1 light chain 3(LC3)- II / LC3- I , phosphorylation (p)-p38 MAPK/p38 MAPK, and p-ERK1/2/ERK1/2 ($P < 0.05$), while cell viability and p-mTOR/mTOR ratio were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with OGD/R group, salidoside group had significantly reduced LDH release rates, apoptosis rates, autophagosome formation rates, levels of IL-6, IL-8, IL-17, and TNF- α , expressions of Bax, Cleaved Caspase-3, Caspase-3, Beclin-1 protein, and ratios of LC3- II / LC3- I ratio, p-p38 MAPK/p38 MAPK, and p-ERK1/2/ERK1/2 ($P < 0.05$), while cell viability and p-mTOR/mTOR ratio were significantly increased ($P < 0.05$). The change of indicators in TBHQ group showed an opposite trend to those in salidoside ($P < 0.05$). Compared with salidoside group, salidoside+TBHQ group had significantly increased LDH release rates, apoptosis rates, autophagosome formation rates, levels of IL-6, IL-8, IL-17 and TNF- α , expressions of Bax, Cleaved Caspase-3, Caspase-3, Beclin-1 protein, and ratios of LC3-II/LC3-I, p-p38 MAPK/p38 MAPK, and p-ERK1/2/ERK1/2 ($P < 0.05$), while cell viability and p-mTOR/mTOR ratio were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Salidoside may inhibit OGD/R-induced hippocampal neuron autophagy and apoptosis by blocking the activation and transmission of MAPK/ERK/mTOR signaling pathway.

[Key words] salidoside; oxygen-glucose deprivation/reperfusion; mitogen-activated protein kinase; hippocampal neurons; autophagy; apoptosis

缺血性脑卒中是可导致残疾或死亡的常见脑血管疾病; 血运重建是其主要的临床治疗方法, 但往往引发再灌注损伤, 造成神经元凋亡、损伤、脑水肿等病变, 引起神经功能障碍^[1-2]。脑缺血/再灌注损伤涉及多种机制, 如兴奋性氨基酸毒性、神经炎症、细胞凋亡及过度自噬等, 通过抑制炎症与过度自噬来阻止神经元的凋亡损伤, 可缓解脑缺血/再灌注损伤^[3-4]。促分裂原活化的蛋白激酶(MAPK)/胞外信号调节激酶(ERK)和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号可通过影响炎症、自噬、细胞凋亡、兴奋性毒性等病理过程介导缺血性脑卒中所致中枢神经系统损伤的发生发展^[5], 激活 MAPK 和 ERK 磷酸化可通过阻止 mTOR 磷酸化而诱导自噬过度激活^[6], 阻止 MAPK/ERK/mTOR 信号途径的激活转导可通过抑制过度激活的自噬来减轻氧-糖剥夺/再灌注(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)诱导的神经元凋亡, 进而对缺血性脑卒中大鼠发挥神经保护作用^[7]。红景天苷是红景天的主要活性成分, 具有较好的神经保护作用, 可增强脑缺血/再灌注损伤后的神经再生, 缓解大鼠相关的神经行为障碍^[8];

还可通过调控 mTOR 信号影响自噬^[9]。红景天苷可通过抑制自噬与炎症减轻 H₂O₂ 诱导的内皮细胞功能障碍^[10], 推测其可能通过抑制 MAPK/ERK/mTOR 信号通路缓解脑缺血/再灌注损伤。本研究通过体外培养小鼠海马神经元细胞系 HT22, 探究红景天苷调节 MAPK/ERK/mTOR 信号通路对 OGD/R 诱导的海马神经元自噬和凋亡的影响, 旨在为相关药物的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 小鼠海马神经元细胞系 HT22(上海镜像绮点细胞技术有限公司), 以 DMEM 培养基加入 10% 优质胎牛血清和 1% 青链霉素双抗, 在 5% CO₂、37 °C、相对湿度 95% 的培养箱中培养。

1.2 主要试剂及仪器 红景天苷(中药对照品, 纯度 98%, DH0037, 成都德思特生物技术有限公司); Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒、特丁基对苯二酚(tert-butylhydroquinone, TBHQ; 纯度 99.89%, HY-100489)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)检测试剂盒、噻唑蓝(MTT)试剂、吲哚橙

(acridine orange hydrochloride, AO)荧光染料购自美国MCE公司;兔抗大鼠Bcl-2相关X蛋白(Bax)、p38蛋白激酶(p38 MAPK)、p-ERK1/2、活化胱天蛋白酶-3(Cleaved caspase-3)、p-p38 MAPK、微管相关蛋白1轻链3(LC3)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、自噬相关蛋白Beclin-1、 β 微管蛋白(β -tubulin)、 β -肌动蛋白(β -actin)、ERK1/2、磷酸化雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)与mTOR抗体、山羊抗兔HRP-二抗以及大鼠白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 、IL-18、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA试剂盒购自英国Abcam公司。

C-1150酶标仪(德国Leica公司);FACS Melody流式细胞仪(美国BD公司);CKX53倒置荧光显微镜(日本Olympus公司);Mini-PROTEAN[™] Tetra蛋白垂直电泳套装(美国Bio-Rad公司)。

1.3 方法

1.3.1 OGD/R诱导细胞模型制备和红景天苷有效作用浓度筛选 解冻复苏HT22细胞,传代培养后于96孔板内接种第3代HT22细胞,接种密度为 1×10^4 个/孔并接种2板,一板细胞正常培养,另一板于培养24 h后以OGD/R诱导制备细胞模型^[11]:将细胞培养基更换为不含葡萄糖的DMEM培养基,并在94% N₂、5% CO₂、1% O₂的缺氧环境下培养4 h,然后将细胞培养基更换为含葡萄糖的DMEM培养基,并在95%空气、5% CO₂环境下培养24 h。OGD/R诱导造模后均使用0、125、250、500、750 μ mol/L的红景天苷干预2板细胞^[10],24 h后加入MTT(5 mg/ml、10 μ l)试剂,孵育4 h,弃上清,溶解晶体后采用酶标仪测定562 nm处各组细胞吸光度(A)值,由于A值与细胞活力呈正相关,故以此值反映各组细胞活力。

1.3.2 HT22细胞分组和干预 于直径60 mm的培养皿内按 1×10^4 个/孔接种第3代HT22细胞,培养24 h后随机分为对照组、OGD/R组、红景天苷组、TBHQ组、红景天苷+TBHQ组。对照组细胞正常培养,不进行任何干预;其余4组按1.3.1中的方法以OGD/R诱导制备细胞模型后,OGD/R组细胞不用药物干预,其他3组细胞均用药物干预24 h [500 μ mol/L红景天苷和(或)50 μ mol/L TBHQ^[12]]。细胞按前述分组接受干预后备用,用于后续各项检测。

1.3.3 细胞损伤程度、凋亡与细胞活力检测 (1)细胞LDH释放率检测。收集各组细胞及其培养基,用RIPA裂解细胞获得各组细胞样品液,然后按LDH测定试剂盒操作说明,于酶标仪内测定各组细胞样品液和培养基中LDH含量,计算LDH释放率,用来评测各组细胞损伤程度,两者间呈正向关系。LDH释放率(%)=培养基中LDH含量/培养基与样品液中LDH含量之和 $\times 100\%$ 。(2)流式细胞术检测细胞凋亡

率。收集各组细胞洗涤后分别加入Annexin V-FITC和PI进行避光孵育,洗涤后上机于流式细胞仪内测定各组细胞凋亡率。(3)MTT法检测细胞活力。于96孔板内接种第3代HT22细胞,接种密度为 1×10^4 个/孔,培养24 h后按“1.3.2”中方法分组干预,然后采用MTT试剂按“1.3.1”中方法检测各组细胞活力。

1.3.4 细胞自噬检测 各组细胞弃培养基后用PBS洗涤,加入AO避光孵育(5 mg/ml, 2 ml)25 min,洗涤后荧光显微镜下观察,细胞内自噬体被AO标记荧光显微镜下呈红色,整体细胞呈绿色荧光,定量出现自噬体的细胞数和总细胞数,以自噬体生成率(自噬体的细胞数/总细胞数 $\times 100\%$)评估细胞自噬强度。

1.3.5 ELISA法测定细胞炎性因子IL-6、IL-8、IL-17与TNF- α 水平 收集各组细胞的培养基,按ELISA试剂盒操作说明于酶标仪内测定IL-6、IL-8、IL-17与TNF- α 水平。

1.3.6 Western blotting 检测各组细胞凋亡、自噬与MAPK/ERK/mTOR信号通路相关蛋白的表达 用RIPA裂解细胞,提取总蛋白,测定其浓度后沸水浴变性,以30 μ g/孔的蛋白量上样电泳,全湿转印后进行封闭,分别孵育抗Bax(1:1000)、p38 MAPK(1:1000)、p-ERK1/2(1:1000)、Cleaved caspase-3(1:500)、p-p38 MAPK(1:1000)、LC3(1:2000)、Caspase-3(1:500)、Beclin-1(1:1000)、 β -tubulin(1:1000)、 β -actin(1:1000)、ERK1/2(1:1000)、p-mTOR(1:1000)与mTOR(1:1000)抗体;TBS缓冲液洗涤后孵育二抗(1:4000);TBS缓冲液洗涤后进行ECL显色,拍照后定量各组蛋白灰度;以 β -actin为内参对照归一化各组Bax、Cleaved caspase-3、Caspase-3、LC3与Beclin-1蛋白表达水平,以 β -tubulin为内参对照归一化各组p-p38 MAPK、p38 MAPK、p-ERK1/2、ERK1/2、p-mTOR、mTOR蛋白表达水平;计算各组LC3 II/LC3 I、p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2、p-mTOR/mTOR比值。

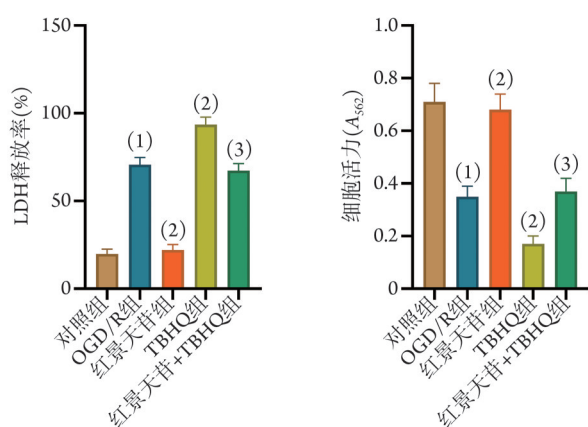
1.4 统计学处理 采用SPSS 26.0软件进行统计分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用SNK-*q*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 红景天苷浓度筛选 125、250、500、750 μ mol/L红景天苷均可增强OGD/R诱导的HT22细胞活力,且细胞活力随红景天苷浓度的升高而增强($P < 0.05$),红景天苷浓度达到500 μ mol/L时其对OGD/R诱导HT22细胞活力的增强作用进入平台期;另外,500 μ mol/L红景天苷对正常培养的HT22细胞活力影响不明显(附图1, <https://dx.doi.org/10.11855/>

j.issn.0577-7402.1815.2025.0528FJ)。因此, 后续实验采用 500 $\mu\text{mol/L}$ 红景天苷处理。

2.2 红景天苷对 OGD/R 诱导的 HT22 细胞 LDH 释放率和细胞活力的影响 与对照组比较, OGD/R 组细胞 LDH 释放率升高, 细胞活力降低 ($P < 0.05$)。与 OGD/R 组比较, 红景天苷组细胞 LDH 释放率降低, 细胞活力升高 ($P < 0.05$); 而 TBHQ 组细胞 LDH 释放率升高, 细胞活力降低 ($P < 0.05$)。与红景天苷组比较, 红景天苷+TBHQ 组细胞 LDH 释放率升高, 细胞活力降低 ($P < 0.05$, 图 1)。



OGD/R. 氧-糖剥夺/再灌注; LDH. 乳酸脱氢酶; TBHQ. 特丁基对苯二酚; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与 OGD/R 组比较, (2) $P < 0.05$; 与红景天苷组比较, (3) $P < 0.05$

图 1 红景天苷对 OGD/R 诱导的 HT22 细胞 LDH 释放率和细胞活力的影响

Fig. 1 Effect of salidroside on LDH release rate and cell viability of HT22 cells induced by OGD/R

2.3 红景天苷对 OGD/R 诱导的 HT22 细胞凋亡与自噬的影响 与对照组比较, OGD/R 组细胞凋亡率与自噬体生成率增高 ($P < 0.05$); 与 OGD/R 组比较, 红景天苷组细胞凋亡率与自噬体生成率降低 ($P < 0.05$); TBHQ 组细胞凋亡率与自噬体生成率增高 ($P < 0.05$); 与红景天苷组比较, 红景天苷+TBHQ 组细胞凋亡率与自噬体生成率增高 ($P < 0.05$, 图 2、3)。

2.4 红景天苷对 OGD/R 诱导的 HT22 细胞炎性因子水平的影响 ELISA 法检测结果显示, 与对照组比较, OGD/R 组 IL-6、IL-8、IL-17、TNF- α 水平增高 ($P < 0.05$); 与 OGD/R 组比较, 红景天苷组上述炎性因子水平降低, TBHQ 组上述细胞炎性因子水平增高 ($P < 0.05$); 与红景天苷组比较, 红景天苷+TBHQ 组上述炎性因子水平增高 ($P < 0.05$, 图 4)。

2.5 红景天苷对 OGD/R 诱导的 HT22 细胞凋亡与自噬相关蛋白表达的影响 Western blotting 检测结果显示, 与对照组比较, OGD/R 组细胞 Bax、Cleaved caspase-3、Caspase-3、Beclin-1 蛋白表达水平与 LC3 II/LC3 I 升高 ($P < 0.05$)。与 OGD/R 组比较, 红景天

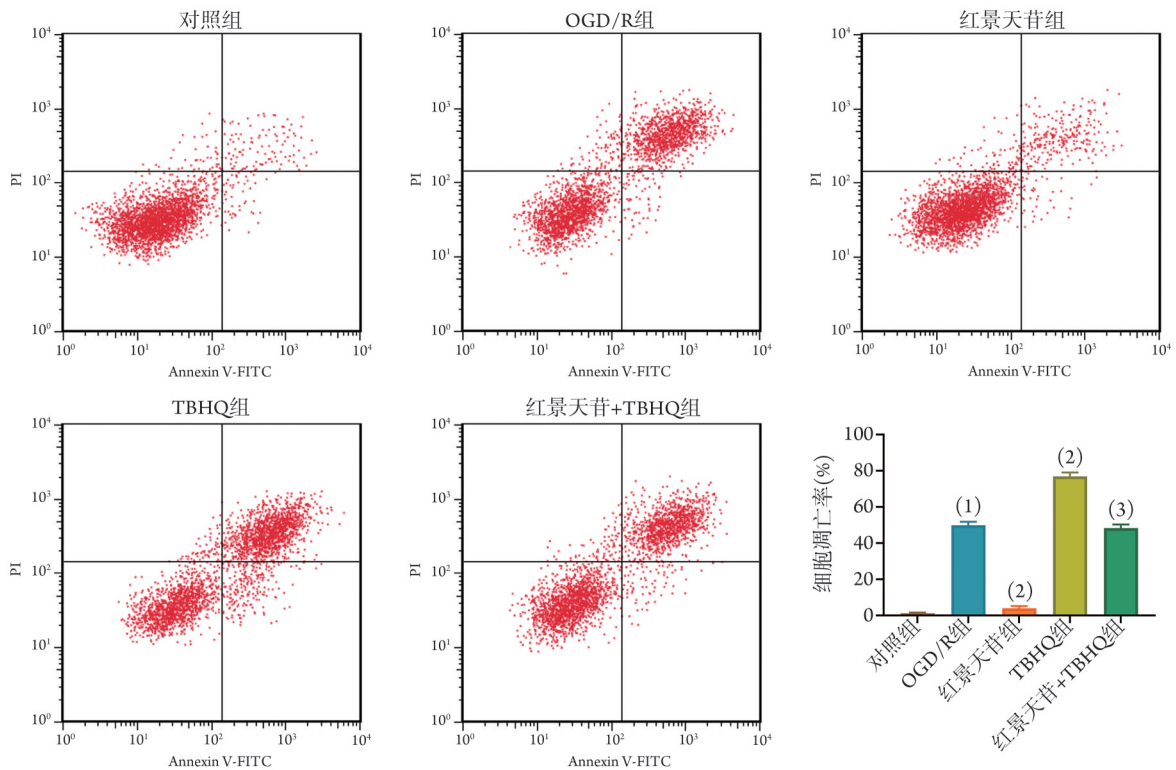
苷组细胞 Bax、Cleaved caspase-3、Caspase-3、Beclin-1 蛋白表达水平与 LC3 II/LC3 I 降低 ($P < 0.05$); TBHQ 组细胞 Bax、Cleaved caspase-3、Caspase-3、Beclin-1 蛋白表达水平与 LC3 II/LC3 I 增高 ($P < 0.05$)。与红景天苷组比较, 红景天苷+TBHQ 组细胞 Bax、Cleaved caspase-3、Caspase-3、Beclin-1 蛋白表达水平与 LC3 II/LC3 I 增高 ($P < 0.05$, 图 5)。

2.6 红景天苷对 OGD/R 诱导的 HT22 细胞 MAPK/ERK/mTOR 通路相关蛋白表达的影响 Western blotting 检测结果显示, 与对照组比较, OGD/R 组 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2 增高, p-mTOR/mTOR 降低 ($P < 0.05$)。与 OGD/R 组比较, 红景天苷组 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2 降低, p-mTOR/mTOR 增高 ($P < 0.05$); TBHQ 组 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2 增高, p-mTOR/mTOR 降低 ($P < 0.05$)。与红景天苷组比较, 红景天苷+TBHQ 组细胞 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2 增高, p-mTOR/mTOR 降低 ($P < 0.05$, 图 6)。

3 讨论

缺血性卒中的致死率和致残率均较高, 且在我国发病率不断增高; 溶栓、缺血区血流灌注恢复和应用神经保护药物是主要的临床治疗方法, 但易发生脑缺血/再灌注损伤, 影响患者脑功能的恢复, 因此, 探索缺血性卒中的新治疗方法具有重大临床价值^[13]。海马神经元死亡是脑缺血/再灌注损伤的主要病理事件, 因而, 以 OGD/R 诱导海马神经元可在细胞水平模拟脑缺血/再灌注损伤^[14]。本研究体外培养小鼠海马神经元细胞系 HT22 并进行 OGD/R 处理, 结果显示, HT22 细胞在 OGD/R 处理后 LDH 释放率, 细胞凋亡率, IL-6、IL-8、IL-17 与 TNF- α 水平, Bax、Cleaved caspase-3 与 Caspase-3 蛋白表达水平明显升高, 细胞活力明显降低, 表明 OGD/R 可诱导海马神经元细胞炎症, 引发细胞损伤并导致其大量凋亡, 提示脑缺血/再灌注损伤细胞模型制备成功。

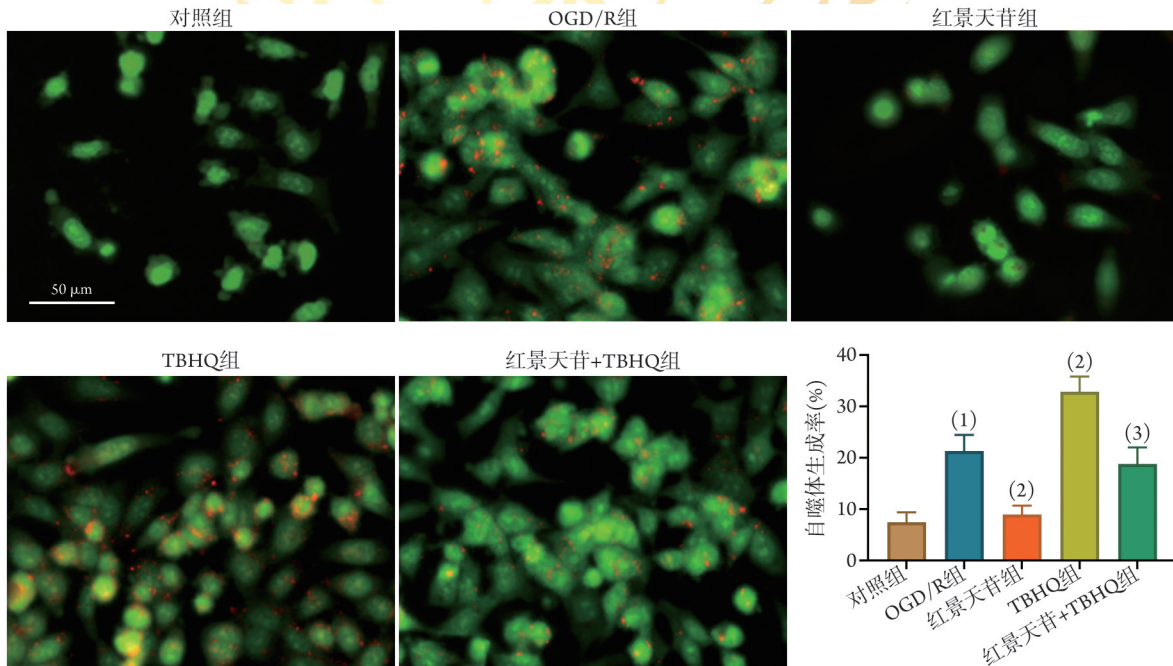
脑缺血再灌注可诱导严重的炎症、氧化应激和过度自噬, 引发神经元的损伤与凋亡, 导致神经功能障碍; 因而, 抑制神经元炎症、自噬及凋亡可能是缓解脑缺血再灌注损伤的有效对策^[14]。红景天苷是提取自红景天的一种酚类物质, 具有抗缺氧、抗炎、抗凋亡、抗衰老等广泛的药理活性, 可通过抑制自噬和细胞凋亡减轻寒冷和缺氧诱导的内皮细胞损伤^[15], 还可通过抑制海马神经元凋亡缓解糖尿病引发的认知功能障碍^[16], 另外红景天苷还能促进脑缺血/再灌注后大鼠的神经再生^[8]。本研究结果显示, 以红景天苷干预 OGD/R 诱导的 HT22 细胞, 可



OGD/R 氧-糖剥夺/再灌注; TBHQ 特丁基对苯二酚; 与对照组比较, (1) $P<0.05$; 与 OGD/R 组比较, (2) $P<0.05$; 与红景天苷组比较, (3) $P<0.05$

图2 红景天苷对 OGD/R 诱导的 HT22 细胞凋亡的影响(流式细胞术)

Fig.2 Effect of salidroside on apoptosis of HT22 cells induced by OGD/R (flow cytometry)



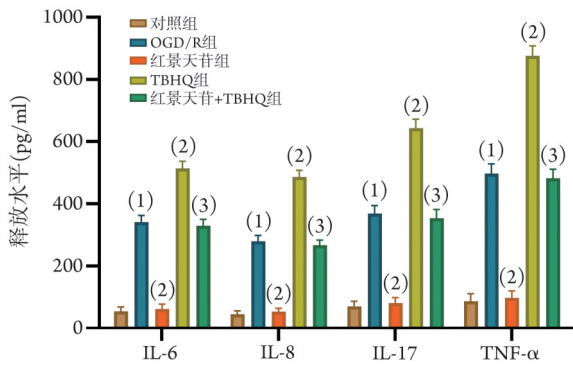
OGD/R 氧-糖剥夺/再灌注; TBHQ 特丁基对苯二酚; 与对照组比较, (1) $P<0.05$; 与 OGD/R 组比较, (2) $P<0.05$; 与红景天苷组比较, (3) $P<0.05$

图3 红景天苷对 OGD/R 诱导的 HT22 细胞自噬体生成的影响(AO 染色, $\times 200$)

Fig.3 Effect of salidroside on autophagosome generation in HT cells induced by OGD/R (AO staining, $\times 200$)

减少炎症因子 IL-6、IL-8、IL-17 与 TNF- α 的释放, 降低自噬体生成率、Beclin-1 蛋白表达、LC3 II/LC3 I, 减轻 OGD/R 诱导的细胞炎症及自噬的过度激活, 进

而降低细胞凋亡率、LDH 释放率和 Bax、Cleaved caspase-3 与 Caspase-3 蛋白表达并升高细胞活力, 抑制 OGD/R 诱导的海马神经元凋亡, 缓解细胞损伤。



OGD/R. 氧-糖剥夺/再灌注; TBHQ. 特丁基对苯二酚; IL. 白细胞介素; TNF-α. 肿瘤坏死因子-α; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与 OGD/R 组比较, (2) $P < 0.05$; 与红景天苷组比较, (3) $P < 0.05$

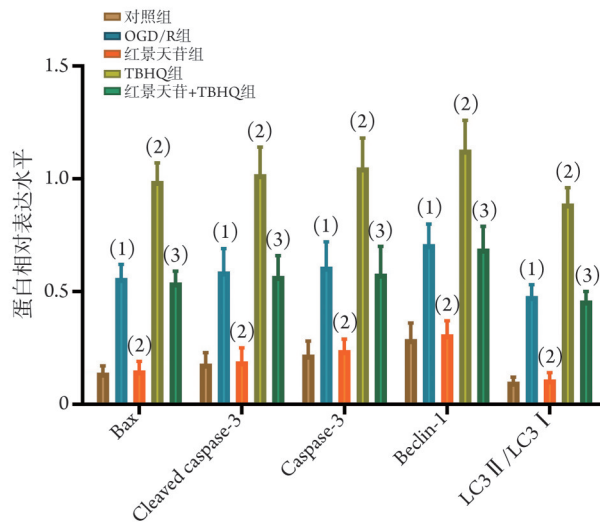
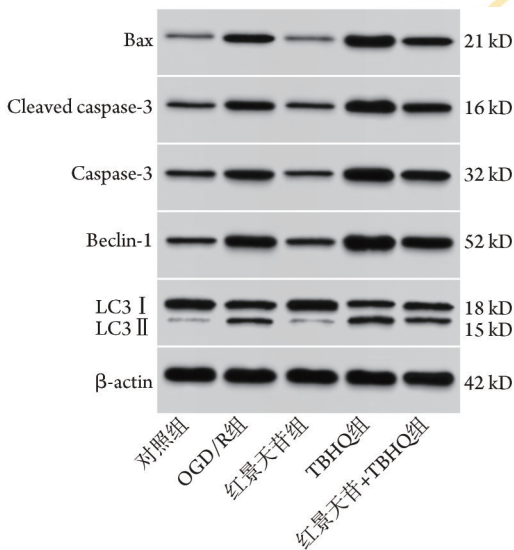
图 4 红景天苷对 OGD/R 诱导的 HT22 细胞炎症因子 IL-6、IL-8、IL-17、TNF-α 水平的影响 (ELISA)

Fig. 4 Effects of solidoside on the levels of IL-6、IL-8、IL-17、TNF-α in HT22 cells induced by OGD/R (ELISA)

MAPK/ERK/mTOR 信号通路可介导包括缺血性卒中在内的神经系统疾病的发生发展, 涉及到对细胞凋亡、自噬、炎症反应、突触可塑性等方面的调控^[7,17], 抑制 MAPK/ERK 信号及激活 mTOR 信号可有效减轻神经炎症及突触可塑性功能障碍^[17], 增强 mTOR 磷酸化可减轻 OGD 诱导的过度自噬通路, 进而通过阻止神经元死亡而对脑缺血动物模型发挥神经保护作用^[18]。本研究结果显示, OGD/R 诱导的 HT22 细胞 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-ERK1/2/ERK1/2 相比正常培养细胞明显升高, 同时 p-mTOR/mTOR

降低, 以红景天苷干预可逆转 MAPK、ERK、mTOR 的磷酸化变化趋势, 表明 MAPK/ERK/mTOR 参与介导 OGD/R 诱导的海马神经元凋亡过程, 并与红景天苷对 OGD/R 诱导的海马神经元自噬与凋亡的抑制作用相关; 以红景天苷和 MAPK 激活剂 TBHQ 联合干预 OGD/R 诱导的 HT22 细胞, 可抑制红景天苷单独干预对 OGD/R 诱导的 HT22 细胞的抗炎作用, 消除其对 OGD/R 诱导的 HT22 细胞过度自噬的抑制作用, 逆转其对 OGD/R 诱导的 HT22 细胞凋亡与细胞损伤的减轻作用, 揭示红景天苷是通过阻止 MAPK 信号激活来抑制 OGD/R 诱导的海马神经元自噬与凋亡。

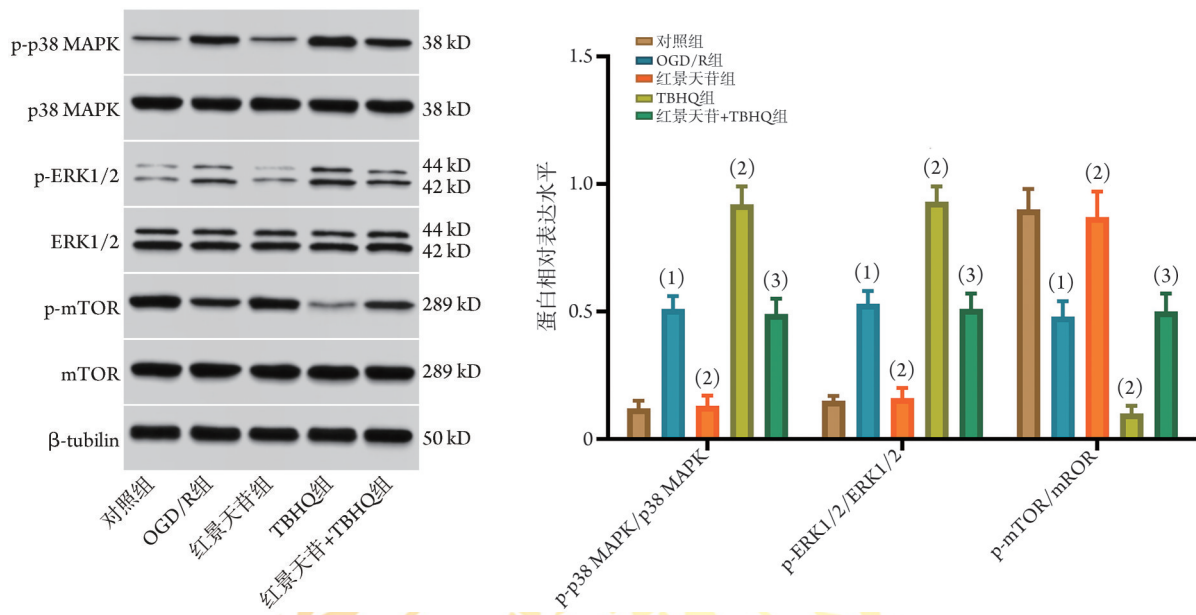
综上所述, 红景天苷可抑制 MAPK、ERK1 的磷酸化, 增强 mTOR 磷酸化, 降低 OGD/R 诱导的炎症因子表达与释放, 抑制由 OGD/R 诱导的海马神经元炎症和过度自噬, 从而减轻细胞损伤并缓解细胞凋亡; 其潜在的神经元保护作用可能与阻止 MAPK/ERK/mTOR 信号通路的激活和转导有关。本研究进一步揭示了红景天苷防治脑缺血/再灌注损伤的潜力, 表明其在缺血性脑卒中临床治疗中具有应用前景。然而, 本研究存在一定的局限性, 例如, 未深入探讨 OGD/R 诱导的海马神经元凋亡过程中自噬的具体调控机制, 且研究仅限于细胞层面, 未进行体内实验验证。因此, 未来需进一步开展体内实验, 深入探究自噬对 OGD/R 诱导的海马神经元凋亡的影响。



OGD/R. 氧-糖剥夺/再灌注; TBHQ. 特丁基对苯二酚; Bax. Bcl-2 相关 X 蛋白; Cleaved caspase-3. 活化胱天蛋白酶-3; Caspase-3. 胱天蛋白酶-3; Beclin-1. 一种自噬相关蛋白; LC3. 微管相关蛋白 1 轻链 3; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与 OGD/R 组比较, (2) $P < 0.05$; 与红景天苷组比较, (3) $P < 0.05$

图 5 红景天苷对 OGD/R 诱导的 HT22 细胞凋亡与自噬相关蛋白表达的影响 (Western blotting)

Fig. 5 Effect of solidoside on expression of apoptosis and autophagy related proteins in HT22 cells induced by OGD/R (Western blotting)



OGD/R. 氧-糖剥夺/再灌注; TBHQ. 特丁基对苯二酚; p38 MAPK. P38 蛋白激酶; p-p38 MAPK. 磷酸化 P38 蛋白激酶; ERK. 胞外信号调节激酶; p-ERK. 磷酸化胞外信号调节激酶; mTOR. 雷帕霉素靶蛋白; p-mTOR. 磷酸化雷帕霉素靶蛋白; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$; 与 OGD/R 组比较, (2) $P < 0.05$; 与红景天苷组比较, (3) $P < 0.05$

图6 红景天苷对 OGD/R 诱导的 HT22 细胞 MAPK/ERK/mTOR 通路相关蛋白表达的影响(Western blotting)

Fig.6 Effect of salidroside on expression of MAPK/ERK/mTOR pathway-related proteins in HT22 cells (Western blotting)

【参考文献】

- [1] Liu J, Guo Y, Zhang Y, *et al.* Astrocytes in ischemic stroke: crosstalk in central nervous system and therapeutic potential[J]. *Neuropathology*, 2024, 44(1): 3-20.
- [2] Sun F, Zhou J, Chen X, *et al.* No-reflow after recanalization in ischemic stroke: from pathomechanisms to therapeutic strategies [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2024, 44(6): 857-880.
- [3] Li L, Krafft PR, Zeng N, *et al.* Microglia autophagy mediated by TMEM166 promotes ischemic stroke secondary to carotid artery stenosis[J]. *Aging Dis*, 2024, 15(3): 1416-1431.
- [4] Mohamed SK, Ahmed AAE, Elkhoely A, *et al.* Sertraline pre-treatment attenuates hemorrhagic transformation induced in rats after cerebral ischemia reperfusion *via* down regulation of neuronal CD163: involvement of M1/M2 polarization interchange and inhibiting autophagy[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2023, 18(4): 657-673.
- [5] Wang W, Lu D, Shi Y, *et al.* Exploring the neuroprotective effects of lithium in ischemic stroke: a literature review[J]. *Int J Med Sci*, 2024, 21(2): 284-298.
- [6] Song J, Hou L, Quan R, *et al.* Synergetic contributions of viral VP1, VP3, and 3C to activation of the AKT-AMPK-MAPK-MTOR signaling pathway for seneca valley virus-induced autophagy[J]. *J Virol*, 2022, 96(2): e0155021-e0155040.
- [7] Xu D, Kong T, Zhang S, *et al.* Orexin-A protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting excessive autophagy through OX1R-mediated MAPK/ERK/mTOR pathway[J]. *Cell Signal*, 2021, 79: 109839-109873.
- [8] Zheng J, Zhang J, Han J, *et al.* The effect of salidroside in promoting endogenous neural regeneration after cerebral ischemia/reperfusion involves notch signaling pathway and neurotrophic factors[J]. *BMC Complement Med Ther*, 2024, 24(1): 293-307.
- [9] Chai Y, Chen F, Li H, *et al.* Mechanism of salidroside regulating autophagy based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Anticancer Drugs*, 2024, 35(6): 525-534.
- [10] Sun L, Li X, Zhang J, *et al.* SAL protects endothelial cells from H₂O₂-induced endothelial dysfunction: regulation of inflammation and autophagy by EZH2[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 142(Pt B): 113060-113077.
- [11] Huang X, Tan J, Ji Y, *et al.* BRCC3 mediates inflammation and pyroptosis in cerebral ischemia/reperfusion injury by activating the NLRP6 inflammasome[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(3): e14697-e14710.
- [12] 张君, 李森, 张倩楠. 羽扇豆醇调节 MAPK/ERK/mTOR 信号通路对 OGD/R 诱导的神经元自噬的影响[J]. *卒中与神经疾病*, 2023, 30(3): 235-241.
- [13] Campbell BC. Hyperacute ischemic stroke care-current treatment and future directions[J]. *Int J Stroke*, 2024, 19(7): 718-726.
- [14] Zhao L, Li Y, Wang W, *et al.* Regulating NCOA4-mediated ferritinophagy for therapeutic intervention in cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Neurochem Res*, 2024, 49(7): 1806-1822.
- [15] Wang H, Wang X, Feng Y, *et al.* Salidroside reduced Ca²⁺-CaM-CAMK II -dependent eNOS/NO activation to decrease endothelial cell injury induced by cold combined with hypoxia[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2024, 82(4): 3477-3487.
- [16] Niu L, Xu M, Liu W, *et al.* The GLCC11/STAT3 pathway: a novel pathway involved in diabetic cognitive dysfunction and the therapeutic effect of salidroside[J]. *J Mol Histol*, 2024, 55(5): 851-861.
- [17] Liang S, Zhao Z, Liu L, *et al.* Research progress on the mechanisms of protocatechuic acid in the treatment of cognitive impairment[J]. *Molecules*, 2024, 29(19): 4724-4740.
- [18] Thiebaut AM, Buendia I, Ginet V, *et al.* Thrombolysis by PLAT/tPA increases serum free IGF1 leading to a decrease of deleterious autophagy following brain ischemia[J]. *Autophagy*, 2022, 18(6): 1297-1317.

(责任编辑: 蒋铭敏)