

[文章编号] 1671-587X(2024)01-0097-09

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240112

## 姜酮通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路减轻 OGD/R 后氧化应激损伤对 HT22 细胞凋亡的抑制作用

侯玮琛<sup>1</sup>, 张桂美<sup>1</sup>, 张舒石<sup>2</sup>

(1. 吉林大学第一医院神经内科与神经科学中心, 吉林 长春 130021; 2. 吉林省长春市人民医院伽马刀中心, 吉林 长春 130051)

**[摘要]** **目的:** 探讨姜酮对氧糖剥夺/复糖复氧 (OGD/R) 后小鼠海马神经元 HT22 细胞的保护作用, 阐明其相关作用机制。**方法:** 培养 HT22 细胞, 设置不同 OGD/R 时间梯度, 建立 OGD/R 细胞损伤模型。HT22 细胞分为对照组、OGD/R 组、OGD/R+1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  姜酮组、OGD/R+10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  姜酮、OGD/R+100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  姜酮组和 OGD/R+0.2% 二甲亚砜 (DMSO) 组, CCK-8 法检测各组细胞活性并计算各组细胞存活率, 确定姜酮最适药物浓度。细胞分为对照组、OGD/R 组、OGD/R+姜酮组和 OGD/R+姜酮+核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 抑制剂 (ML385) 组, OGD/R+姜酮组细胞经姜酮给药处理 4 h 后予以 OGD 8 h 和复糖复氧 8 h 处理, OGD/R+姜酮+ML385 组细胞在姜酮给药前予以 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ML385 预处理 6 h, CCK-8 法检测各组细胞活性, Western blotting 法检测各组细胞中 Nrf2、血红素加氧酶 1 (HO-1)、B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2) 和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 蛋白表达水平, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测各组细胞培养上清中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 水平。**结果:** 与对照组比较, HT22 细胞经 OGD 8 h 和复糖复氧 8 h 处理后细胞存活率低于 50%, 以 OGD 8 h 和复糖复氧 8 h 建立 HT22 细胞 OGD/R 模型。与 OGD/R 组比较, OGD/R+不同剂量姜酮组细胞存活率均不同程度升高, 其中 OGD/R+100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  姜酮组细胞存活率升高最明显 ( $P<0.01$ ), 故选用 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  姜酮用于后续实验。与对照组比较, OGD/R 组细胞活性明显降低 ( $P<0.01$ ), 细胞中 Nrf2、HO-1 和 Bax 蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.01$ ), Bcl-2 蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.05$ ), 细胞培养上清中 SOD 活性明显降低 ( $P<0.01$ ), MDA 水平明显升高 ( $P<0.01$ ); 与 OGD/R 组比较, OGD/R+姜酮组细胞活性明显升高 ( $P<0.01$ ), 细胞中 Nrf2、HO-1 和 Bcl-2 蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), Bax 蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.05$ ), 细胞培养上清中 SOD 活性明显升高 ( $P<0.01$ ), MDA 水平明显降低 ( $P<0.01$ ); 与 OGD/R+姜酮组比较, OGD/R+姜酮+ML385 组细胞活性明显降低 ( $P<0.01$ ), 细胞中 Nrf2、HO-1 和 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.01$ ), Bax 蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.01$ ), 细胞培养上清中 SOD 活性明显降低 ( $P<0.01$ ), MDA 水平明显升高 ( $P<0.05$ )。**结论:** 姜酮可通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路减轻 OGD/R 后氧化应激损伤对 HT22 细胞凋亡的抑制作用。

**[关键词]** 姜酮; 糖氧剥夺; HT22 神经元; 核因子 E2 相关因子 2; 血红素加氧酶 1; 氧化应激; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R743.3 **[文献标志码]** A

**[收稿日期]** 2023-02-26

**[基金项目]** 吉林省科技厅医疗卫生人才专项项目 (JLSWSRCZX2021-045)

**[作者简介]** 侯玮琛 (1987-), 女, 河北省石家庄市人, 主治医师, 医学博士, 主要从事神经内科基础和临床方面的研究。

**[通信作者]** 张舒石, 副主任医师 (E-mail: 2354710925@qq.com)

## Inhibitory effect of gingerone on apoptosis of HT22 cells by alleviation oxidative stress damage after OGD/R through activating Nrf2/HO-1 signaling pathway

HOU Weichen<sup>1</sup>, ZHANG Guimei<sup>1</sup>, ZHANG Shushi<sup>2</sup>

(1. Department of Neurology and Neuroscience Center, First Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Center of Gamma Knife, People's Hospital, Changchun City, Jilin Province, Changchun 130051, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the protective effect of gingerone on the hippocampal neuron HT22 cells after oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R), and to clarify the related mechanism. **Methods:** The HT22 cells were cultured, and the OGD/R cell injury model was established by setting the gradient of OGD/R time. The HT22 cells were divided into control group, OGD/R group, OGD/R+1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  gingerone group, OGD/R+10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  gingerone group, OGD/R+100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  gingerone group, and OGD/R+0.2% dimethyl sulfoxide (DMSO) group. The viability of the cells in various groups was detected by CCK-8 assay; the survival rates of the cells in various groups were calculated to determine the optimal drug concentration of gingerone. The cells were divided into control, OGD/R group, OGD/R+gingerone, and OGD/R+gingerone+nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) inhibitor (ML385) groups. The cells in OGD/R+gingerone group were treated with gingerone for 4 h before OGD treatment for 8 h followed by reoxygenation for 8 h, and the cells in OGD/R+gingerone+ML385 group were treated with 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ML385 for 6 h before gingerone treatment. The viability of the cells in various groups was detected by CCK-8 assay; the expression levels of Nrf2, heme oxygenase-1 (HO-1), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), and Bcl-2-associated X protein (Bax) proteins in the cells in various groups were detected by Western blotting method; the activity of superoxide dismutase (SOD) and the level of malondialdehyde (MDA) in the cell culture supernatant in various groups were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. **Results:** Compared with control group, the survival rate of the HT22 cells was below 50% after treated with OGD for 8 h and reoxygenation for 8 h, so the HT22 cell OGD/R model was established by treated with OGD for 8 h and reoxygenation for 8 h. Compared with OGD/R group, the survival rates of the cells in OGD/R+different doses of gingerone groups were increased to various extents, and the survival rate of the cells in OGD/R+100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  gingerone group was significantly increased ( $P<0.01$ ); so 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  gingerone was used for the subsequent experiment. Compared with control group, the viability of the cells in OGD/R group was significantly decreased ( $P<0.01$ ), and the expression levels of Nrf2, HO-1, and Bax proteins in the cells were significantly increased ( $P<0.01$ ), while the expression level of Bcl-2 protein in the cells was significantly decreased ( $P<0.05$ ), and the SOD activity in the cell culture supernatant was significantly decreased ( $P<0.01$ ), and the level of MDA was significantly increased ( $P<0.01$ ); compared with OGD/R group, the viability of the cells in OGD/R+gingerone group was significantly increased ( $P<0.01$ ), and the expression levels of Nrf2, HO-1, and Bcl-2 proteins in the cells were significantly increased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), while the expression level of Bax protein in the cells was decreased ( $P<0.05$ ), the SOD activity in the cell culture supernatant was significantly increased ( $P<0.01$ ), and the level of MDA was significantly decreased ( $P<0.01$ ); compared with OGD/R+gingerone group, the viability of the cells in OGD/R+gingerone+ML385 group was significantly decreased ( $P<0.01$ ), and the expression levels of Nrf2, HO-1, and Bcl-2 proteins were significantly decreased ( $P<0.01$ ), while the

expression level of Bax protein in the cells was significantly increased ( $P < 0.01$ ), the SOD activity in the cell culture supernatant was significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and the level of MDA was significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Gingerone alleviates the oxidative stress damage, and thereby plays an inhibitory effect on the apoptosis of the HT22 neurons by activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway after OGD/R.

**KEYWORDS** Gingerone; Oxygen-glucose deprivation; HT22 neuron; Nuclear factor erythroid-2-related factor 2; Heme oxygenase 1; Oxidative stress; Apoptosis

缺血性脑卒中是指由于脑动脉狭窄或闭塞和脑供血不足导致的脑组织坏死, 是一种急性脑血管疾病, 其患病率、致残率、死亡率和复发率均较高<sup>[1]</sup>。目前, 通过在时间窗内及时进行药物溶栓或机械取栓以实现血管再通和急性期改善侧支循环是治疗缺血性脑卒中最关键和最有效的方法。但上述治疗在改善脑缺血半暗带区组织灌注的同时也会造成难以避免的继发性神经损伤, 即脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)<sup>[2]</sup>。CIRI 是缺血性脑卒中后继发性脑损伤的主要原因, 可加剧氧化应激损伤、炎症反应和组织水肿等后续病理改变。

CIRI 是涉及多层次、多通路和多靶点的复杂瀑布式级联化学损伤过程, 发病机制非常复杂, 其中氧化应激损伤是重要机制之一<sup>[3]</sup>。核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2) 是重要的内源性氧化应激调节因子, 通过与抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 结合调节编码抗氧化蛋白的表达, 包括超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 等, 抑制活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的过度产生<sup>[4]</sup>。因此, 调控 Nrf2/HO-1 信号通路可能在调控缺血性脑卒中后细胞氧化与抗氧化平衡中发挥重要作用。

生姜是姜科植物姜的根茎, 是一种广泛使用的食品成分, 在传统医学中经常被用来治疗各种病症, 包括感冒、恶心、哮喘、出血和肌肉疼痛<sup>[5-6]</sup>。此外, 生姜还用于癌症、骨病、代谢功能障碍和血管疾病的治疗<sup>[7-8]</sup>。生姜的主要成分包括姜酚、姜酮、姜烯酚和姜酮酚等, 由于上述成分的构象不同, 可通过靶向不同的配体位点治疗年龄相关性神经系统疾病, 包括阿尔茨海默病、帕金森病和中风等<sup>[8]</sup>。姜酮的化学名为 4-(4-羟基-3-甲氧基丙基)-2-丁酮, 是一种从生姜中提取的活性酚类化合物, 是生姜的关键有效成分, 具有抗肿瘤、抗炎和抗氧

化等多种药理活性。目前关于姜酮能否改善缺血后神经功能损伤及相关分子机制尚不明确。本研究拟从细胞水平研究姜酮能否通过 Nrf2/HO-1 信号通路减轻氧化应激损伤并抑制 HT22 细胞凋亡, 进而发挥神经保护作用。

## 1 材料与方法

**1.1 实验细胞、主要试剂和仪器** 小鼠海马神经元 HT22 细胞购自中国科学院细胞库。姜酮 (纯度  $\geq 98\%$ , CAS 122-48-5) 购自上海融禾医药科技发展有限公司。无糖 DMEM 培养基、高糖 DMEM 培养基和胎牛血清均购自美国 Gibco 公司, 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自美国 Sigma 公司, CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所, 蛋白定量试剂盒和超敏 ECL 化学发光试剂盒购自美国 Thermo 公司, 核蛋白抽提试剂盒购自美国 Solarbio 公司, Nrf2、HO-1、B 细胞淋巴瘤 2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 和 GAPDH 抗体均购自美国 Abcam 公司, 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 预制胶和 SDS-PAGE 上样缓冲液购自美国 Invitrogen 公司, 辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠二抗和辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗购自北京博奥森生物技术有限公司, 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和 SOD 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所, Nrf2 抑制剂 ML385 (CAS 846557-71-9) 购自美国 MedChemExpress 公司。

**1.2 细胞培养和确定制备糖氧剥夺/复糖复氧 (oxygen and glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 细胞模型最佳时间** 采用物理缺氧法处理生长状态良好的 HT22 细胞建立体外 OGD/R 模型, 调节三气培养箱参数使培养环境中含有 5%  $\text{CO}_2$ 、94.9%  $\text{N}_2$  和 0.1%  $\text{O}_2$ , 更换无糖 DMEM 培养基实现 OGD; 随后恢复培养箱内环境为 5%  $\text{CO}_2$  和

95% 空气, 更换为含糖 DMEM 培养基实现复糖复氧。采用 CCK-8 法检测 OGD/R 不同时间点各组细胞活性, 采用酶标仪在波长 450 nm 处检测各孔吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率, 确定 OGD/R 时间点, 用于后续实验。细胞存活率 = (实验组平均 A 值 - 空白组 A 值) / (对照组平均 A 值 - 空白组 A 值) × 100%。

HT22 细胞 OGD 0、2、4、6、8 和 12 h 后, 不同时间点细胞存活率见图 1A, 随着 OGD 时间延长, 细胞存活率逐渐降低, OGD 处理 8 h 时细胞存活率已接近 50%, 故选用 OGD 8 h 作为后续实验时间。随后, HT22 细胞经 OGD 处理 8 h 后分别设置复糖复氧 0、2、4、6、8 和 12 h 时间梯度, 不同复糖复氧时间点细胞存活率见图 1B, 随着复糖复氧时间延长细胞存活率逐渐减低, 8 h 时细胞存活率明显降低, 因此选用 OGD 8 h 后复糖复氧 8 h 为制备 OGD/R 模型最佳时间。

### 1.3 姜酮保护 OGD/R 损伤后 HT22 细胞最适浓度确定

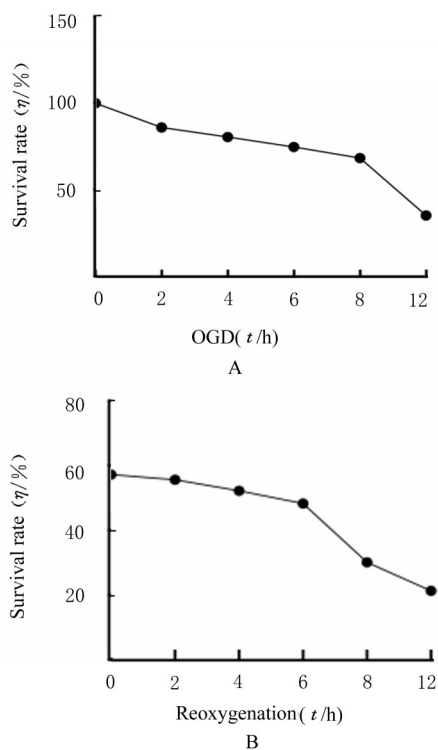
将 HT22 细胞分为对照组、OGD/R 组、

OGD/R+1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  姜酮组、OGD/R+10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  姜酮组、OGD/R+100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  姜酮组和溶剂对照组 (OGD/R+0.2% DMSO 组), OGD/R+不同剂量姜酮组 HT22 细胞经不同浓度姜酮给药处理 4 h 后予以 OGD 8 h 和复糖复氧 8 h 处理。采用 CCK-8 法检测各组细胞存活率, 确定姜酮最适浓度。细胞存活率计算方法见“1.2”。

**1.4 细胞分组** HT22 细胞分为对照组、OGD/R 组、OGD/R+姜酮组和 OGD/R+姜酮+ML385 组, 其中 OGD/R+姜酮组 HT22 细胞经姜酮处理 4 h 后予以 OGD 8 h 和复糖复氧 8 h 处理, OGD/R+姜酮+ML385 组 HT22 细胞在姜酮处理前予以 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ML385 预处理 6 h。

**1.5 CCK-8 法检测各组细胞存活率** 选取各组生长状态良好的 HT22 细胞, 0.125% 胰酶消化、离心、重悬, 细胞悬液按  $1\times 10^5\text{cm}^{-2}$  的密度接种于 96 孔细胞培养板中, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 设 5 个复孔。37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、95% 空气和饱和湿度下无菌培养至细胞融合率达 75% 左右。按照实验分组对每组细胞分别进行 OGD/R 及各种干预剂处理。每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液, 继续培养 4 h, 采用酶标仪在波长 450 nm 处检测各孔 A 值, 计算各组细胞存活率, 计算方法见“1.2”。

**1.6 Western blotting 法检测各组细胞中 Nrf2、HO-1、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平** HT22 细胞按  $1\times 10^5\text{cm}^{-2}$  的密度接种于 25  $\text{cm}^2$  细胞培养瓶, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、95% 空气和饱和湿度下无菌培养至细胞融合率达 75% 左右。按照实验分组分别进行 OGD/R 和各种干预剂等处理。吸取各组细胞培养上清备用, 采用试剂盒提取各组细胞总蛋白和核蛋白, BCA 法测定各组上清液蛋白浓度, 用裂解液调平后加入 4×Loading buffer (体积比 3:1), 充分混匀后 95  $^{\circ}\text{C}$  金属浴 10 min。按照实验分组上样, 每孔上样 20  $\mu\text{L}$ , 使用 SDS-PAGE 预制胶电泳分离不同相对分子质量蛋白质并转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉室温封闭聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜 2 h 后, 加入一抗 Nrf2 (1:2000)、HO-1 (1:2000)、Bcl-2 (1:1000)、Bax (1:1000) 和 GAPDH (1:2000) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。洗膜后加入二抗稀释液室温孵育 2 h, 滴加显色液后采用凝胶图像处理系统获取各目的蛋白条带及内参蛋白条带, 采用 Image J 软件分析各组细胞中目的蛋白条带和内参蛋白条带平均



A: Survival rates of cells at different OGD time points;  
B: Survival rates of cells at different R time points.

图1 CCK-8法检测不同 OGD/R 时间点 HT22 细胞存活率

Fig. 1 Survival rates of HT22 cells at different OGD/R time points detected by CCK-8 assay

灰度值, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带平均灰度值/内参蛋白条带平均灰度值。

**1.7 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测各组细胞培养上清中 SOD 活性和 MDA 水平** 将各组细胞培养上清液 3 500 r·min<sup>-1</sup> 低温离心 10 min 后取上清, 分别使用试剂盒检测 SOD 活性和 MDA 水平, 具体操作严格按照说明书步骤进行。

**1.8 统计学分析** 采用 SPSS 25.0 统计软件进行统计学分析。所有实验结果均来自单独培养的 3 个批次 HT22 细胞, 各组细胞存活率, 各组细胞中 Nrf2、HO-1、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平, 各组细胞培养上清中 SOD 活性和 MDA 水平, 均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 所有数据在进行统计分析前均进行正态性检验, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 SNK-*q* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 姜酮保护 OGD/R 损伤后 HT22 细胞的最适浓度** 与对照组比较, OGD/R 组细胞存活率明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与 OGD/R 组比较, OGD/R+1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  姜酮组和 OGD/R+0.2% DMSO 组细胞存活率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); OGD/R+10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  姜酮组和 OGD/R+100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  姜酮组细胞存活率明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。随着浓度升高, 姜酮对 OGD/R 处理后 HT22 细胞保护作用逐渐增强, 姜酮对 OGD/R 处理后 HT22 细胞保护最适浓度为 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。见表 1。

**2.2 各组细胞存活率** 与对照组比较, OGD/R 组

表 1 不同剂量姜酮处理后各组 HT22 细胞存活率

Tab. 1 Survival rates of HT22 cells in various groups after treated with different doses of gingerone

Group	Survival rate
Control	100.0±6.8
OGD/R	49.8±3.7*
OGD/R+1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ gingerone	56.1±6.8
OGD/R+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ gingerone	65.9±4.5 <sup>△</sup>
OGD/R+100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ gingerone	79.6±8.1 <sup>△△</sup>
OGD/R+0.2% DMSO	50.3±7.4

\* $P < 0.01$  vs control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs OGD/R group.

细胞存活率明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与 OGD/R 组比较, OGD/R+姜酮组细胞存活率明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与 OGD/R+姜酮组比较, OGD/R+姜酮+ML385 组 HT22 细胞存活率明显降低 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 各组细胞存活率

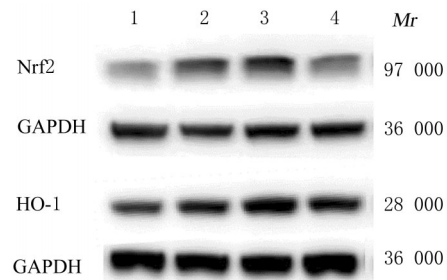
Tab. 2 Survival rates of cells in various groups

( $n=5, \bar{x} \pm s, \eta/\%$ )

Group	Survival rate
Control	100.0±6.8
OGD/R	48.1±3.5*
OGD/R+gingerone	73.4±7.7 <sup>△</sup>
OGD/R+gingerone+ML385	39.7±6.9 <sup>#</sup>

\* $P < 0.01$  vs control group; <sup>△</sup> $P < 0.01$  vs OGD/R group; <sup>#</sup> $P < 0.01$  vs OGD/R+gingerone group.

**2.3 各组细胞中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平** 与对照组比较, OGD/R 组细胞中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与 OGD/R 组比较, OGD/R+姜酮组细胞中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与 OGD/R+姜酮组比较, OGD/R+姜酮+ML385 组细胞中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.01$ )。见图 2 和表 3。



Lane 1: Control group; Lane 2: OGD/R group; Lane 3: OGD/R+gingerone group; Lane 4: OGD/R+gingerone+ML385 group.

图 2 Western blotting 法检测各组细胞中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达电泳图

Fig. 2 Electrophoregram of expressions of Nrf2 and HO-1 proteins in cells in various groups detected by Western blotting method

**2.4 各组细胞中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平** 与对照组比较, OGD/R 组细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), Bax 蛋白表达水平明显升高

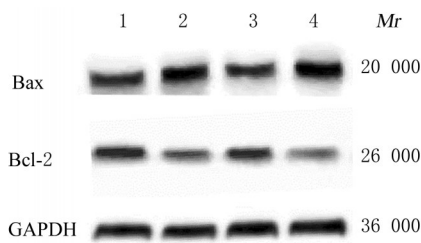
表3 各组细胞中Nrf2和HO-1蛋白表达水平

Tab. 3 Expression levels of Nrf2 and HO-1 proteins in cells in various groups ( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

Group	Nrf2 protein	HO-1 protein
Control	1.000±0.045	1.000±0.026
OGD/R	1.391±0.071*	1.364±0.046*
OGD/R+gingerone	1.782±0.021 <sup>△</sup>	1.892±0.031 <sup>△</sup>
OGD/R+gingerone+ML385	0.719±0.037 <sup>#</sup>	0.752±0.053 <sup>#</sup>

\* $P<0.01$  vs control group; <sup>△</sup> $P<0.05$  vs OGD/R group; <sup>#</sup> $P<0.01$  vs OGD/R+gingerone group.

( $P<0.01$ ); 与 OGD/R 组比较, OGD/R+姜酮组细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.01$ ), Bax 蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.05$ ); 与 OGD/R+姜酮组比较, OGD/R+姜酮组+ML385 组细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.01$ ), Bax 蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.01$ )。见图 3 和表 4。



Lane 1: Control group; Lane 2: OGD/R group; Lane 3: OGD/R+gingerone group; Lane 4: OGD/R+gingerone+ML385 group.

图3 Western blotting法检测各组细胞中Bcl-2和Bax蛋白表达电泳图

Fig. 3 Electrophoregram of expressions of Bcl-2 and Bax proteins in cells in various groups detected by Western blotting method

表4 各组细胞中Bax和Bcl-2蛋白表达水平

Tab. 4 Expression levels of Bax and Bcl-2 proteins in cells in various groups ( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

Group	Bcl-2 protein	Bax protein
Control	1.000±0.042	1.000±0.035
OGD/R	0.802±0.015*	1.458±0.037**
OGD/R+gingerone	1.416±0.028 <sup>△△</sup>	1.083±0.047 <sup>△</sup>
OGD/R+gingerone+ML385	0.428±0.019 <sup>#</sup>	1.849±0.034 <sup>#</sup>

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs control group; <sup>△</sup> $P<0.05$ , <sup>△△</sup> $P<0.01$  vs OGD/R group; <sup>#</sup> $P<0.01$  vs OGD/R+gingerone group.

## 2.5 各组细胞培养上清中SOD活性和MDA水平

与对照组比较, OGD/R 组细胞培养上清中

SOD 活性明显降低 ( $P<0.01$ ), MDA 水平明显升高 ( $P<0.01$ ); 与 OGD/R 组比较, OGD/R+姜酮组细胞培养上清中 SOD 活性明显升高 ( $P<0.05$ ), MDA 水平明显降低 ( $P<0.01$ ); 与 OGD/R+姜酮组比较, OGD/R+姜酮组+ML385 组细胞培养上清中 SOD 水平明显降低 ( $P<0.01$ ), MDA 水平明显升高 ( $P<0.05$ )。见表 5。

表5 各组细胞培养上清中SOD活性和MDA水平

Tab. 5 SOD activities and MDA levels in cell culture supernatant in various groups ( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

Group	SOD activity [ $\lambda_B/(U \cdot mg^{-1})$ ]	MDA level [ $m_B/(mol \cdot g^{-1})$ ]
Control	42.40±1.25	0.265±0.026
OGD/R	22.64±0.97*	0.668±0.046*
OGD/R+gingerone	32.36±1.81 <sup>△</sup>	0.385±0.031 <sup>△</sup>
OGD/R+gingerone+ML385	16.36±1.27 <sup>#</sup>	0.614±0.053 <sup>#</sup>

\* $P<0.01$  vs control group; <sup>△</sup> $P<0.01$  vs OGD/R group; <sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>#</sup> $P<0.01$  vs OGD/R+gingerone group.

## 3 讨论

脑血管急性闭塞后脑血流中断导致脑内葡萄糖和氧气供应减少, 随即发生一系列急性代谢变化进而介导氧化应激损伤, 后者进一步触发瀑布级联反应引起细胞死亡, 包括细胞内钙超载、兴奋性氨基酸毒性、线粒体损伤、氧化应激、血小板激活/聚集、白细胞浸润、补体激活和血脑屏障破坏等多种复杂的病理生理过程<sup>[2]</sup>。其中梗死核心区血流灌注严重不足, 神经元发生不可逆性迅速坏死。周围的缺血半暗带区灌注相对不足, 神经元功能受到抑制并在一段时间内仍处于代谢活跃状态, 此时脑组织功能损伤以凋亡为主且在一定时限内是可逆的, 也是缺血性脑卒中后需要挽救的区域。半暗带脑组织若长时间得不到再灌注, 梗死核心区可扩伸至缺血半暗带区, 最终导致严重的神经元死亡和神经功能障碍<sup>[9]</sup>。由此可见, 脑缺血的治疗过程是多重衔接和精密调控的过程, 也是诸多调控因子参与调节的关键条件, 因此脑缺血损伤后抑制神经元凋亡具有重要意义。体外细胞 OGD/R 模型是模拟体内缺血性脑卒中较理想的模型。本研究采用 HT22 细胞建立细胞 OGD/R 模型, 设置不同 OGD/R 时间梯度, 采用 CCK-8 法检测各时间点细胞存活率, 结果显示: OGD 8 h 和复糖复氧 8 h 后 HT22 细胞存活率低于正常 50%, 因此选用 OGD 8 h 后复糖复氧 8 h

为制备 OGD/R 模型最佳时间。

姜酮具有抗肿瘤、抗炎和抗氧化等多种药理活性。研究<sup>[10]</sup>显示: 姜酮通过上调结肠癌 HCT116 细胞促凋亡基因, 促进细胞凋亡并抑制细胞增殖, 进而发挥抗肿瘤作用。研究<sup>[11]</sup>显示: 姜酮对心肌肥厚、高脂血症、左心室功能不全、三磷酸腺苷功能障碍和电解质紊乱均有预防作用, 特别是在心肌梗死大鼠模型中, 姜酮通过调控 Bcl-2 家族基因, 抑制含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶介导的死亡信号通路和 Fas 受体, 抑制异丙肾上腺素诱导的心肌梗死大鼠的氧化应激损伤, 发挥抗炎和抗血栓作用。VAIBHAV 等<sup>[12]</sup>研究发现: 姜酮是一种有效的抗氧化剂, 通过抑制内在程序性细胞死亡 (intrinsic programmed cell death, iPCD) 和氧化应激挽救缺血半暗带神经元。此外, 有研究<sup>[13]</sup>显示: 姜酮可能对帕金森等神经退行性疾病具有一定的防治作用, 但其具体机制尚不明确。本研究结果显示: 不同剂量姜酮对 OGD/R 诱导的 HT22 细胞损伤具有保护作用, 且高剂量姜酮组保护作用更明显; OGD/R 诱导后的 HT22 细胞予以高剂量姜酮处理, 细胞培养上清中 MDA 水平降低, SOD 活性明显升高, 细胞中 Bax 蛋白表达水平降低, 而 Bcl-2 蛋白表达水平升高, 表明姜酮可改善 OGD/R 诱导的 HT22 细胞氧化应激损伤, 抑制细胞凋亡进而发挥细胞保护作用。

氧化应激损伤是 CIRI 的重要机制之一。细胞中氧气和能量耗竭后可产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS), ROS 过量产生可导致亚细胞结构如脂质膜、线粒体和 DNA 的广泛破坏。研究<sup>[14-15]</sup>表明: Nrf2/HO-1 信号通路在机体氧化应激和炎症反应过程中发挥着重要的调控作用。Nrf2 是一种细胞中广泛存在的重要的转录因子, 属于内源性抗氧化防御的重要调控因子, 正常状态下与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 以 Nrf2-Keap1 复合体形式存在而无活性, ROS 能够破坏该复合体结构并激活 Nrf2, 活化 Nrf2 核转位并与特定基因启动子区域的 ARE 结合, 诱导抗氧化应激蛋白的表达, 如 HO-1、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 和 SOD 等, 从而降低氧化应激损伤<sup>[16-18]</sup>。HO-1 是血红素降解的限速酶, 可以催化血红素基团降解产生游离铁、一氧化碳和胆绿素等抑制氧化应激和炎症反应<sup>[19]</sup>, 也与细胞增殖有关联<sup>[20]</sup>。研究<sup>[4, 21-22]</sup>表

明: 谷氨酸诱导的 HT22 细胞可通过 HO-1 的表达减轻氧化细胞毒性, 发挥细胞保护作用。HO-1 在 CIRI 和肺缺血再灌注损伤中发挥重要作用<sup>[23-24]</sup>。研究<sup>[25]</sup>显示: Nrf2 可减轻 CIRI, 且 Nrf2 对脑缺血再灌注的保护作用也是通过调控下游抗氧化蛋白实现的。在脑组织损伤时, Nrf2 活化后能够进入细胞核内与 ARE 序列进行识别并结合, 上调 HO-1 的表达, 增强抗氧化应激能力。激活 Nrf2/HO-1 信号通路可以产生抗氧化应激反应, 继而对脑组织发挥保护效应<sup>[26]</sup>。动物实验<sup>[27]</sup>证实: 脑梗死缺血区皮质中 Nrf2 和下游蛋白 HO-1 表达水平在缺血 24 h 时明显增加, 是影响脑梗死的关键因子。藏红花素或尼莫地平干预能够明显上调 Nrf2 和 HO-1 表达并降低胞核 NF- $\kappa$ B p65/胞浆 NF- $\kappa$ B p65 比值, 表明藏红花素对 CIRI 大鼠氧化应激和炎症反应的抑制作用可能与激活 Nrf2/HO-1 通路及抑制 NF- $\kappa$ B p65 核转位有关<sup>[28]</sup>。研究<sup>[29]</sup>表明: Nrf2 对脑缺血的保护作用可通过调控下游相关蛋白实现, 且过表达的 Nrf2 可通过干预抗氧化和抗凋亡相关蛋白对神经细胞发挥保护作用。本研究结果表明: 给予 Nrf2 抑制剂 ML385 后, 姜酮的抗氧化作用也被抑制, 表明姜酮的抗氧化作用可能通过 Nrf2 介导; 给予姜酮干预后 OGD/R 诱导的 HT22 细胞死亡明显减少, 给予 Nrf2 抑制剂 ML385 处理后可逆转姜酮的细胞保护作用, 提示姜酮的细胞保护作用可能与 Nrf2 有关; Western blotting 法检测细胞中 HO-1 和核内 Nrf2 的表达, 结果显示: 姜酮可明显上调 Nrf2 的表达并促进其核转位, 进而促进 HO-1 的表达, 发挥抗氧化应激作用。

综上所述, 本研究通过 HT22 细胞体外 OGD/R 模型证实姜酮通过上调 Nrf2 表达并促进其核转位, 进而促进 HO-1 的表达, 减弱 OGD/R 诱导的 HT22 细胞氧化应激损伤并抑制细胞凋亡, 发挥细胞保护作用。此外, 姜酮激活 Nrf2/HO-1 通路是否在 CIRI 模型小鼠中仍具有抗氧化应激损伤及抑制细胞凋亡作用仍需进一步研究证实。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

侯玮琛参与实验设计和论文撰写, 张桂美参与数据收集整理和统计图绘制, 张舒石参与论文修改和论文审阅。

## [参考文献]

- [1] GBD2019 DISEASES AND INJURIES COLLABORATORS. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *Lancet*, 2020, 396(10258): 1204-1222.
- [2] WU M Y, YANG G T, LIAO W T, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(4): 1650-1667.
- [3] DATTA A, SARMAH D, MOUNICA L, et al. Cell death pathways in ischemic stroke and targeted pharmacotherapy[J]. *Transl Stroke Res*, 2020, 11(6): 1185-1202.
- [4] BERECZKI D J R, BALLA J, BERECZKI D. Heme oxygenase-1: clinical relevance in ischemic stroke [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(20): 2229-2235.
- [5] CHOI J G, KIM S Y, JEONG M, et al. Pharmacotherapeutic potential of ginger and its compounds in age-related neurological disorders [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 182: 56-69.
- [6] MASCOLO N, JAIN R, JAIN S C, et al. Ethnopharmacologic investigation of ginger (*Zingiber officinale*) [J]. *J Ethnopharmacol*, 1989, 27(1/2): 129-140.
- [7] PRASAD S, TYAGI A K. Ginger and its constituents: role in prevention and treatment of gastrointestinal cancer [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2015, 2015: 142979.
- [8] SOHRABJI F, BAKE S, LEWIS D K. Age-related changes in brain support cells: implications for stroke severity [J]. *Neurochem Int*, 2013, 63(4): 291-301.
- [9] MOSKOWITZ M A, LO E H, IADECOLA C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments [J]. *Neuron*, 2010, 67(2): 181-198.
- [10] MOHD YUSOF Y A. Gingerol and its role in chronic diseases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2016, 929: 177-207.
- [11] PRINCE P S M, HEMALATHA K L. A molecular mechanism on the antiapoptotic effects of zingerone in isoproterenol induced myocardial infarcted rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 821: 105-111.
- [12] VAIBHAV K, SHRIVASTAVA P, TABASSUM R, et al. Delayed administration of zingerone mitigates the behavioral and histological alteration via repression of oxidative stress and intrinsic programmed cell death in focal transient ischemic rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2013, 113: 53-62.
- [13] KABUTO H, YAMANUSHI T T. Effects of zingerone [4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-butanone] and eugenol [2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol] on the pathological progress in the 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease mouse model [J]. *Neurochem Res*, 2011, 36(12): 2244-2249.
- [14] 任辉邦, 张斌, 尹启超, 等. 山姜素通过PI3K/Nrf2/HO-1通路减少炎症和氧化应激反应改善盲肠结扎和穿刺诱导的脓毒症大鼠的急性肺损伤 [J]. *免疫学杂志*, 2021, 37(7): 575-583.
- [15] 李彦霖, 郁叶, 郭婷莉, 等. 氧化应激和炎症反应中Nrf2/HO-1与MAPK的相关性 [J]. *医学综述*, 2021, 27(1): 8-13.
- [16] LAI C C, CHEN Q, DING Y T, et al. Emodin protected against synaptic impairment and oxidative stress induced by fluoride in SH-SY<sub>5</sub>Y cells by modulating ERK1/2/Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Environ Toxicol*, 2020, 35(9): 922-929.
- [17] WANG J, ISHFAQ M, XU L, et al. METTL3/m6A/miRNA-873-5p attenuated oxidative stress and apoptosis in colistin-induced kidney injury by modulating Keap1/Nrf2 pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 517.
- [18] LEE D S, CHA B Y, WOO J T, et al. Acerogenin A from acer nikoense maxim prevents oxidative stress-induced neuronal cell death through Nrf2-mediated heme oxygenase-1 expression in mouse hippocampal HT22 cell line [J]. *Molecules*, 2015, 20(7): 12545-12557.
- [19] YANG Y, XI Z Y, XUE Y, et al. Hemoglobin pretreatment endows rat cortical astrocytes resistance to hemin-induced toxicity via Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 361(2): 217-224.
- [20] LIU S S, LI G M, TANG H J, et al. Madecassoside ameliorates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in rats by activating the Nrf2-HO-1 pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2019, 709: 134386.
- [21] 张昊悦, 赵蓓, 王业皇, 等. 大黄素通过调节Nrf2/HO-1和MAPKs抑制炎症和氧化应激机制研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(9): 1063-1068.
- [22] LI H L, TANG Z Y, CHU P, et al. Neuroprotective effect of phosphocreatine on oxidative stress and mitochondrial dysfunction induced apoptosis *in vitro* and *in vivo*: involvement of dual PI3K/Akt and Nrf2/HO-1 pathways [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 120: 228-238.
- [23] 巩敏杰, 安佳琪, 吴锋, 等. 褪黑素通过Nrf2/HO-1信号通路减轻大鼠脑缺血再灌注损伤 [J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2019, 40(6): 857-863.
- [24] 汪洋, 张辉, 马东波, 等. 麦冬多糖通过Nrf2/HO-1信号通路对肺缺血再灌注损伤大鼠肺组织的保护作用 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2023, 58(4): 464-468.

- [25] MIAO Z Y, XIA X, CHE L, et al. Genistein attenuates brain damage induced by transient cerebral ischemia through up-regulation of Nrf2 expression in ovariectomized rats[J]. *Neurol Res*, 2018, 40(8): 689-695.
- [26] 伍慧茹, 张磊, 黄美伊, 等. 芬戈莫德(FTY720)通过激活 Nrf2/HO-1 通路促进大鼠脑缺血再灌注损伤后神经功能恢复[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2021, 37(5): 415-420.
- [27] HU Q W, ZUO T R, DENG L, et al.  $\beta$ -Caryophyllene suppresses ferroptosis induced by cerebral ischemia reperfusion via activation of the NRF2/HO-1 signaling pathway in MCAO/R rats [J]. *Phytomedicine*, 2022, 102: 154112.
- [28] 杨欢欢, 段毅. 藏红花素通过 Nrf2/HO-1 通路对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障的保护作用[J]. *天津中医药*, 2022, 39(8): 1069-1076.
- [29] 刘宇彤, 车楠, 李莉, 等. 花青素通过 Nrf-2/HO-1 信号通路调控哮喘气道炎症[J]. *免疫学杂志*, 2019, 35(1): 36-41.