咖啡豆醇通过调控IκBα/NF-κB通路抑制小胶质细胞活化改善脊髓损伤后小鼠的运动功能

夏金枝[1,5],陈 悦[3,5],任 侣[3,5],李 静[1,2],宋 雪[2,4],陶 露[2,4],胡建国[1,2]
蚌埠医科大学第一附属医院[1]检验科,[2]炎症相关性疾病基础与转化研究安徽省重点实验室,[3]康复科,[4]中心实验室,安徽 蚌埠 233004,[5]蚌埠医科大学检验医学院,安徽 蚌埠 233030

摘要:目的 探究咖啡豆醇(Kah)在脊髓损伤后通过抑制小胶质细胞活化介导的炎症反应对运动功能恢复的影响,并阐明其作用机制。**方法** 随机将54只8~10周龄的C57BL/6J小鼠分为Sham组(只进行椎板剥离),脊髓损伤(SCI)组(剥离椎板并撞击脊髓),Kah组(术后每日腹腔注射20 mg/kg的Kah),18只/组。采用BMS评分、足迹分析、游泳实验评估小鼠的运动功能。通过HE、快蓝染色及尼氏染色评估脊髓损伤区域、髓鞘完整性和神经元存活。使用脂多糖刺激BV2细胞建立体外炎症模型及BV2/HT22神经元共培养体系,利用不同浓度Kah干预,通过免疫荧光对体内外活化的小胶质细胞及神经元凋亡的数量进行评估;通过Western blotting检测凋亡相关蛋白(Bax/Bcl-2/cleaved caspase3)及IκBα/NF-κB通路蛋白。通过qRT-PCR、ELISA检测炎症因子(TNF-α、IL-6、IL-1β)水平。使用NF-κB通路激活剂PMA于体外实验进行干预,分析Kah的作用机制。**结果** Kah治疗改善了SCI小鼠的运动功能;组织学检测显示,Kah组脊髓组织病理性损伤区域较SCI组缩小($P<0.001$),同时髓鞘化面积及神经元数目增加($P<0.001$);体内外实验显示,Kah通过抑制小胶质细胞的活化并减少其释放炎症因子缓解神经元凋亡;Western blotting结果显示,Kah可降低NF-κB及IκBα的磷酸化水平。体外免疫荧光结果证实,与Kah干预组相比,给予PMA后,活化的BV2细胞及凋亡的神经元增加($P<0.05$)。**结论** Kah通过抑制NF-κB通路调控小胶质细胞活化来促进SCI后运动功能的恢复,为临床治疗提供了潜在新策略。

关键词:脊髓损伤;咖啡豆醇;小胶质细胞;神经元凋亡;NF-κB

Kahweol improves motor function of mice with spinal cord injury by inhibiting microglial activation *via* regulating the IκBα/NF-κB pathway

XIA Jinzhi[1,5], CHEN Yue[3,5], REN Lü[3,5], LI Jing[1,2], SONG Xue[2,4], TAO Lu[2,4], HU Jianguo[1,2]
[1]Department of Clinical Laboratory, [2]Anhui Provincial Key Laboratory of Basic and Translational Research of Inflammation-related Diseases, [3]Department of Rehabilitation Medicine, [4]Department of Central Laboratory, First Affiliated Hospital of Bengbu Medical University, Bengbu 233004, China; [5]College of Laboratory Medicine, Bengbu Medical University, Bengbu 233030, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of kahweol for promoting motor function recovery in mice with spinal cord injury (SCI). **Methods** Fifty-four 8- to 10- week-old C57BL/6J mice were randomized equally into sham operation (laminectomy only) group, SCI group (laminectomy with spinal cord contusion), and Kahweol treatment group (with daily intraperitoneal injection of 20 mg/kg Kahweol following SCI). Motor function of the mice was evaluated using BMS scores, footprint analysis, and swimming test, and SCI area, myelin integrity, and neuron survival were assessed using HE, LFB, and Nissl staining. In a co-culture system of lipopolysaccharide (LPS)-stimulated BV2 cells and HT22 neurons, the effects of different concentrations of Kahweol and PMA, a NF-κB pathway activator, on the number of activated microglia and apoptotic neurons were evaluated with immunofluorescence staining, and the changes in apoptosis-related proteins and IκBα/NF-κB pathway proteins were detected using Western blotting. The levels of inflammatory factors (TNF-α, IL-6, and IL-1β) were measured by qRT-PCR and ELISA. **Results** In the mice with SCI, kahweol treatment significantly promoted motor function recovery, reduced injury area in the spinal cord tissue, and increased the myelinated area and number of neurons. In both the mouse models and the cell co-culture system, kahweol treatment effectively alleviated neuronal apoptosis by inhibiting microglial activation and reducing the release of inflammatory factors. The results of Western blotting showed that kahweol significantly decreased the phosphorylation levels of NF-κB and IκBα. In the cell co-culture system, PMA obviously attenuated the inhibitory effect of kahweol on BV2 cell activation and neuronal apoptosis. **Conclusion** Kahweol promotes motor function recovery of mice with SCI by suppressing microglial activation *via* inhibiting the NF-κB pathway, which shed light on a new strategy for clinical treatment of SCI.

Keywords: spinal cord injury; kahweol; microglia; neuronal apoptosis; nuclear factor-κB

脊髓损伤(SCI)是由创伤、缺血或退行性病变等多因素造成的疾病,全球每年新增病例超50万例[1,2],患者常遗留严重运动、感觉功能障碍。研究表明,SCI后小胶质细胞激活所产生的炎症因子会加重炎症反应、促进神经元凋亡[3]。NF-κB信号通路是炎症调控的关键枢纽[4]。研究证实,抑制NF-κB通路活性可缓解小胶质细胞的活化,减轻SCI后的神经炎症并改善运动功能恢

收稿日期:2025-05-16
基金项目:国家自然科学基金(82471399)
Supported by National Natural Science Foundation of China (82471399).
作者简介:夏金枝,在读硕士研究生,E-mail: Jinzhixia0511@163.com
通信作者:胡建国,教授,博士生导师,E-mail: jghu9200@bbmu.edu.cn

复，这提示该通路可能是干预SCI的重要分子靶点[5-7]。目前，SCI的治疗药物较少，常用药为甲基强的松龙，但该药长期使用可能会造成胃溃疡、胃肠道出血、抑制免疫系统功能等[8, 9]，因此，寻找新的治疗药物迫在眉睫。咖啡豆醇(Kah)是从咖啡豆中提取的天然二萜，具有抗炎、抗癌、神经保护等功能[10, 11]。研究表明，Kah可通过NF-κB信号通路抑制炎症反应，使炎症因子表达下调，从而改善肝脏炎症[12]；可减少创伤性脑损伤小鼠的继发性脑损伤并改善神经功能缺陷[13]；也可使神经元细胞免受帕金森病相关神经毒素6-羟基多巴胺（6-OHDA）诱导的细胞死亡[14]。但关于Kah在SCI中的作用未见报道。本研究通过构建SCI小鼠模型及脂多糖(LPS)诱导的BV2细胞炎症细胞模型，对SCI小鼠的运动功能及BV2细胞的活化状况进行分析，从而探讨Kah在SCI中的作用机制，为临床提供新的治疗方案。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 本研究使用54只雌性SPF级C57BL/6小鼠(6~8周龄，体质量18~20 g)，由江苏集萃药康生物科技股份有限公司提供。设置动物房环境为：温度22±1 ℃且保持12 h明暗循环，所有小鼠在标准化饲养条件下(灭菌饲料/饮用水自由获取)完成7 d环境适应，通过随机数生成器法将小鼠分为3组：Sham组、SCI组及Kah组，18只/组。

1.1.2 主要试剂 Kah(杭州生物科技有限公司)，PMA(MedChemExpress)，甲苯胺蓝(MACKLIN)，MEM培养基、DMEM培养基、胎牛血清(FBS)(Gibco)，青/链霉素(PS, HyClone)，LPS(100 ng/mL, Sigma)，酶联免疫吸附检测试剂盒(BOSTER)，PCR反应试剂盒、cDNA反转录试剂盒(Vazyme)，引物(TNF-α、IL-6、IL-1β、GAPDH，上海生物工程有限公司合成)，BCA蛋白定量试剂盒、Bcl-2（1∶1000），Bax（1∶1000）、cleaved caspase3（1∶1000）、p-NF-κB p65(1∶2000)、NF-κB（1∶2000）、NeuN（1∶1000 ）、山羊抗兔IgG-FITC（1∶1000 ）、山羊抗鼠IgG-Alexa Fluor 555（1∶1000）(Abcam)，p-IκBα(1∶1000)、IκBα(1∶2000)(CST)，HRP标记山羊抗兔/鼠IgG(1∶3000，中杉金桥)，CD11b抗体(1∶500, Servicebio)，CD68抗体(1∶500, Proteintech)，cleaved caspase3抗体(1∶200, Invitrogen)。

1.1.3 SCI造模及干预 采用1%戊巴比妥钠经腹腔注射实施小鼠全身麻醉，使用电动剃毛器去除T9周围背侧被毛，以碘伏进行消毒，随后施行T9椎板切除术，完整暴露脊髓组织。将小鼠固定于IH-0400脊髓打击仪，调整至脊髓水平位，以65 kdyne冲击力垂直撞击脊髓表面[15]，撞击时间约为0.1 s。造模成功指征：损伤部位可见淤血、双后肢痉挛及尾部回缩[16]。Sham组仅行椎板切除，不予撞击；SCI组剥离椎板并撞击脊髓；Kah组于SCI造模后当日开始腹腔注射Kah(20 mg/kg[13, 17, 18]，以DMSO溶解后生理盐水稀释)，1次/d至取材前24 h终止。各组术后每日皮下注射抗生素(0.5 mL/次)并人工排尿2次/d，直至自主排尿恢复。实验获本单位动物实验伦理委员会审查批准(伦理批号：[2024]第078号)。

1.2 行为学评分

1.2.1 巴索小鼠评分量表(BMS)评分 为评估小鼠后肢的运动功能，分别于SCI造模后第1、3、7、14、21、28天，通过随机抽样法选取5只/组小鼠进行双盲实验。对小鼠后肢运动协调性，躯干稳定性及尾巴位置进行0~9分的综合评分[19]。

1.2.2 游泳实验 造模后第7、14、21、28天，随机选取5只/组小鼠进行游泳实验，由2名独立的研究员进行双盲测试。根据小鼠前肢依赖情况、后肢运动能力、身体平衡能力进行0~17分的评分[20]。

1.2.3 足迹分析 造模后第28天，将无毒红色染料涂布于小鼠前肢，蓝色染料涂于后肢，使其行走于铺有白纸的窄暗道上。根据后肢足印特征评分：0分：后肢拖行，无清晰足印；1分：3个脚印中最少有3个脚趾清晰可见；2分：内旋或外旋超过基线值的2倍；3分：存在单一方向性旋转异常(内旋或外旋)；4分：脚印形态对称完整，无旋转或拖曳现象[21, 22]。

1.3 组织取检与组织学评估

1.3.1 组织取检 分别于术后第7、28天经腹腔注射1%戊巴比妥钠将小鼠麻醉，经心脏灌注PBS及4%多聚甲醛后，取距离损伤中心前后1 cm的脊髓节段。脊髓组织经脱水、OCT包埋、连续冰冻切片后，即可进行后续的HE、LFB、Nissl染色，以此评估脊髓损伤面积、髓鞘化程度以及神经元数量。

1.3.2 HE染色 将制备好的切片首先经水洗去除OCT，再经苏木精染液浸染后进行分化及返蓝，伊红复染后依次经梯度乙醇脱水、二甲苯透明，中性树胶封固。通过观察损伤区域面积评估病理变化，利用Image J软件进行分析。

1.3.3 快蓝染色 组织切片经乙醇处理(75%、95%乙醇各2 min)后，于室温浸染0.1%快蓝染液2 h，随后4 ℃低温孵育20 min；使用95%乙醇及蒸馏水冲洗，采用0.05%碳酸锂水溶液进行分化，以蒸馏水终止分化反应。最后经梯度乙醇脱水后，以二甲苯透明处理并用中性树胶封片。显微图像通过Image J软件进行染色区域定量分析。

1.3.4 尼氏染色 组织切片经蒸馏水浸洗(5 min×2次)后，于0.05%甲苯胺蓝染液染色5 min，使用蒸馏水冲

洗。以90%乙醇溶液进行分化处理，以蒸馏水终止反应。经无水乙醇浸泡脱水后，以二甲苯透明处理并用中性树胶封片。显微图像通过Image J软件进行染色区域定量分析。

1.4 细胞实验

1.4.1 BV2细胞培养与处理 BV2细胞采用含10%FBS及1%PS的MEM培养基，于37 ℃、5% CO_2恒温培养箱中培养，待细胞生长至80%密度时传代。

实验分两阶段设计：第1阶段为基础药效分组，旨在筛选Kah的有效干预浓度，设置为3组：对照组：正常培养24 h；LPS诱导组：加入1 μg/mL LPS刺激24 h；Kah浓度梯度组：1 μg/mL LPS联合12.5、25、50 μmol/L Kah共处理24 h，最终确定25 μmol/L为后续实验的最佳干预浓度。

第2阶段为机制验证分组，为明确Kah是否通过调控NF-κB通路发挥作用，引入NF-κB通路激活剂PMA进行rescue实验，分为3组：对照组：正常培养24 h；PMA组：10 nmol/L PMA单独处理24 h[23, 24]；PMA+Kah干预组：10 nmol/L PMA与25 μmol/L Kah共同处理24 h。

1.4.2 BV2联合HT22细胞共培养模型 HT22细胞采用含10%FBS及1%PS的DMEM培养基，培养条件同BV2。实验时，将BV2接种于24孔板并按1.4.1的培养方案进行分组，各组培养24 h后弃上清液，经PBS漂洗后更换含对应处理因子的MEM培养基刺激12 h；再次清除培养液，PBS润洗后更换MEM培养基恢复培养12 h。最终收集各组条件培养基，与新鲜DMEM培养基等体积混合后干预HT22细胞，继续培养24 h用于后续功能检测。

1.5 酶联免疫吸附测定（ELISA）

采用ELISA实验对小鼠脊髓组织和BV2细胞上清液中的炎症因子（TNF-α、IL-6、IL-1β）进行定量分析。脊髓组织匀浆后离心取上清液；细胞培养24 h后收集上清。ELISA操作步骤包括包被、洗涤、封闭、加样、加检测抗体、加酶标二抗、显色和终止反应，通过酶标仪测定吸光度$A_{450\,nm}$，并根据标准曲线计算炎症因子的浓度。

1.6 免疫荧光染色

组织经固定后制备冰冻切片；细胞经4%多聚甲醛固定30 min，用PBS漂洗3次（5 min/次），再额外进行0.2% Triton X-100透化处理15 min。使用5% BSA封闭30 min后，加入一抗：CD11b（1∶500）、CD68（1∶500）、NeuN（1∶1000）、Cleaved caspase3（1∶200），4 ℃孵育过夜。次日PBS清洗3次，避光孵育荧光二抗：山羊抗兔IgG-FITC（1∶1000）、山羊抗鼠IgG-Alexa Fluor 555（1∶1000）2 h，最后用DAPI复染细胞核并封片，于荧光显微镜下拍照观察。

1.7 qRT-PCR

使用Trizol法提取BV2以及脊髓组织总RNA，按照逆转录试剂盒说明书，使用HisyGo RT Red SuperMix（+gDNA Wiper）将RNA逆转录为cDNA。使用qPCR试剂盒进行PCR反应。反应条件：95 ℃预变性5 min，95 ℃变性10 s，60 ℃退火延伸30 s。使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因相对表达量。引物由上海生物工程有限公司合成（表1）。

表1 引物序列

Tab.1 Primer sequences (5' to 3') for RT-qPCR

Gene (mice)	Forward primer	Reverse primer
GAPDH	TGGCCTTCCGTGTTCCTAC	GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA
TNF-α	CAGGCGGTGCCTATGTCTC	CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG
IL-6	TCTATACCACTTCACAAGTCGGA	GAATTGCCATTGCACAACTCTTT
IL-1β	GAAATGCCACCTTTTGACAGTG	TGGATGCTCTCATCAGGACAG-

1.8 Western blotting

细胞或组织样本经含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液裂解提取蛋白。采用BCA法对蛋白浓度定量。取等量蛋白与5×SDS-PAGE上样缓冲液按1∶4的比例混合，于沸水浴中加热变性10 min，随后12 000×g离心5 min去除沉淀。将处理后的蛋白样品进行SDS-PAGE电泳，30 min后转膜，使用5%脱脂牛奶封闭1 h后加入一抗：Bax（1∶1000）、Bcl-2（1∶1000）、cleaved caspase3（1∶1000）、IκBα（1∶2000）、p-IκBα（1∶1000）、NF-κB（1∶2000）、p-NF-κB（1∶2000）、β-actin（1∶3000）4 ℃孵育过夜。第2天用TBST洗涤3次，加入HRP标记山羊抗兔/鼠IgG二抗（1∶3000）室温孵育1 h，再用TBST洗涤3次，最后用ECL化学发光仪采集信号并通过Image J软件进行条带分析。

1.9 统计学分析

统计分析均使用SPSS 26.0软件。定量资料以均数±标准差表示，采用独立样本t检验进行两组间比较，采用单因素方差分析分析3组以上数据差异。$P<0.05$

为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Kah促进脊髓损伤后小鼠运动功能及受损组织修复

BMS评分显示，与SCI组相比，Kah组自术后第14天起BMS运动功能评分增高（$P<0.01$，图1A）。术后28 d足迹分析显示，Kah组步态明显清晰且评分增高（$P<0.01$，图1B、C）。游泳实验显示，相对于SCI组，Kah组小鼠游泳实验评分提高（$P<0.05$，图1D、E）。观察新鲜脊髓组织结果显示，Kah组脊髓表面的出血及水肿状况较SCI组得到改善（图1F）。HE、快蓝及尼氏染色结果显示，与SCI组相比，Kah组小鼠脊髓组织损伤面积降低、髓鞘化面积增高、脊髓前角运动神经元增多（$P<0.01$，图1G~L）。

2.2 Kah可减轻SCI后神经元的凋亡

免疫荧光双染结果表明，Kah组小鼠凋亡神经元数量较SCI组下降（$P<0.01$，图2A、B）。Western blotting显示SCI后第7天，与SCI组相比，Kah组小鼠cleaved caspase3和Bax表达水平下降，Bcl-2升高（$P<0.05$，图2C~F）。

2.3 Kah可减轻脊髓损伤后炎症相关因子的表达并抑制小胶质细胞的活化

免疫荧光双染结果显示，$CD11b^+CD68^+$细胞在SCI组小鼠中增多且荧光强度增高，而在Kah组中这种现象则被逆转（$P<0.01$，图3A、B）。qRT-PCR和ELISA结果显示，SCI后，小鼠体内TNF-α、IL-6及IL-1β的mRNA及蛋白含量表达上升，而经Kah给药治疗后降低（$P<0.01$，图3C~H）。

2.4 Kah对SCI的保护性作用可能与NF-κB信号通路有关

Western blotting分析显示，相对于SCI组，Kah组IκBα和NFκB蛋白的磷酸化程度减少（$P<0.05$，图4A~C）。

2.5 Kah可抑制LPS诱导的BV2细胞活化和炎症因子的表达

通过构建体外炎症细胞模型，结果发现，与LPS诱导组相比，Kah干预抑制了BV2细胞活化（$P<0.01$，图5A、B）。qRT-PCR与ELISA结果显示，Kah可降低LPS诱导BV2细胞释放的促炎因子（TNF-α、IL-6和IL-1β）水平（$P<0.01$，图5C~H）。

2.6 Kah可减轻BV2细胞活化引起的神经元凋亡（BV2细胞与神经元共培养）

免疫荧光染色结果显示，与LPS组相比，Kah干预组凋亡神经元的数量减少（$P<0.01$，图6A、B）。Western blotting结果显示，Kah干预后，HT22细胞中Bax、cleaved caspase3蛋白的表达相比于LPS组降低，而Bcl-2蛋白的表达增加（$P<0.05$，图6C~F）。

2.7 Kah抑制BV2细胞活化可能与NF-κB信号通路有关

Western blotting结果显示，相对于LPS组，Kah干预后IκBα和NFκB蛋白的磷酸化程度降低（$P<0.05$，图7A~C）。

2.8 Kah通过抑制NF-κB通路减轻BV2细胞活化及其导致的神经元凋亡

与PMA组相比，PMA+Kah组的BV2细胞活化数量减少（$P<0.001$，图8A、B）。同时，该组神经元凋亡水平较PMA组降低（$P<0.001$，图8C、D）。Western blotting结果进一步证实，Kah可有效逆转PMA的促凋亡作用（$P<0.05$，图8E、F）。

3 讨论

本研究发现，Kah可促进SCI小鼠的运动功能恢复，并改善损伤脊髓组织病理形态；Kah通过抑制小胶质细胞活化及促炎因子的释放，减少神经元凋亡；进一步机制实验证实，该神经保护作用与抑制NF-κB核转位介导的炎症反应密切相关。Kah的抗炎与神经保护作用已在多种疾病模型中得到验证。在炎症调控方面，其可通过抑制LPS诱导的巨噬细胞炎症通路激活，减少促炎因子释放[25]；在脓毒症引起的急性肺损伤模型中，Kah能减轻肺部病理损伤并降低炎症因子水平[26]；在神经系统中，Kah能抑制创伤性脑损伤小鼠体内小胶质细胞及巨噬细胞过度活化，减少炎症介导的继发性损伤，从而改善神经功能缺陷[13]。但由于其在SCI中的作用尚未见报道，故本实验采用SCI小鼠模型，探讨其是否会促进SCI小鼠运动功能的恢复。既往研究报道BMS评分和游泳实验可对小鼠后肢关节运动、躯干稳定性、协调性等进行整体评估，是衡量运动功能的有效指标[27, 28]。本研究显示，Kah组小鼠的BMS评分、游泳实验评分均高于SCI组。足迹分析可对小鼠步态进行精准的量化，以对SCI恢复中后期小鼠运动功能进行更精细的评价[29]。本实验结果显示，Kah组足迹清晰度及评分较SCI组提升，表明Kah在SCI小鼠运动功能恢复的早期至中后期均发挥关键调控作用。SCI后，脊髓组织表现为组织结构紊乱、白质脱髓鞘、神经元受损等[30]。本研究通过组织病理学染色证明，经Kah治疗后，受损脊髓组织损伤面积减小、髓鞘化面积与存活神经元数量增加。这提示，Kah不仅能减轻原发性损伤后的组织破坏，还可能通过促进髓鞘修复和神经元保护来促进脊髓组织的恢复。

SCI诱导的神经元凋亡会进一步导致神经功能缺损，这是制约临床疗效提升的关键病理机制。已有研究指出Kahweol对暴露于甲基乙二醛的人类神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞具有保护功能[31]。为明确Kah在SCI

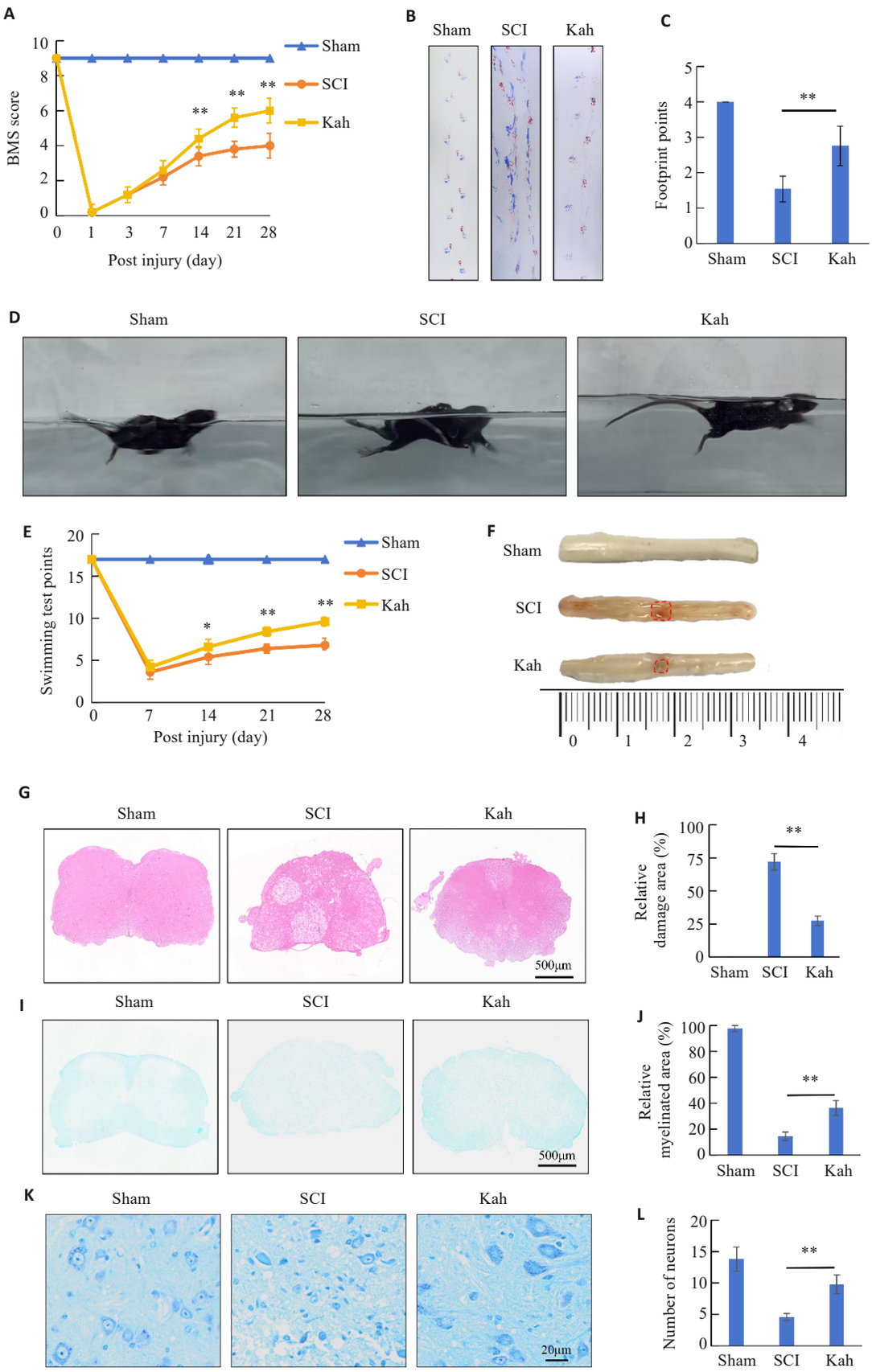

图1 Kah可改善SCI小鼠的运动功能及SCI后脊髓组织的病理损伤

Fig.1 Kahweol (Kah) improves motor function and alleviates spinal cord tissue pathologies of SCI mice. **A**: BMS Score. **B**, **C**: Footprint score. **D**, **E**: Swimming experiments. **F**: Dorsal view of fresh spinal cords on days 7. **G**: HE staining. **H**: Quantitative analysis of the lesion areas in the 3 groups. **I**: LFB staining. **J**: Quantitative analysis of residual myelination in the 3 groups. **K**: Nissl staining. **L**: Quantitative analysis of the number of motor neurons in the 3 groups. n=5 in each group. *P<0.05, **P<0.01.

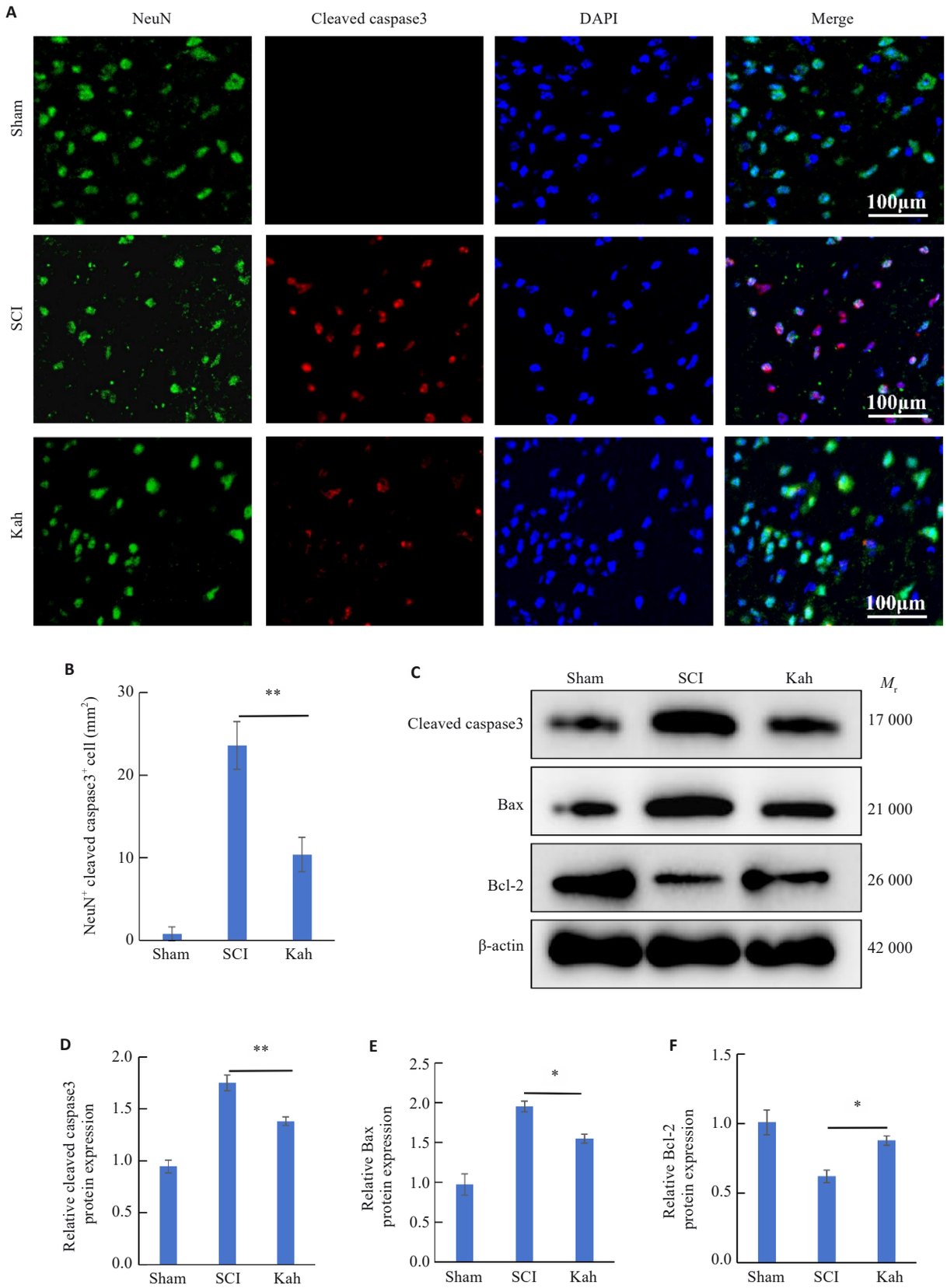

图2 Kah可减轻脊髓损伤后神经元的凋亡

Fig.2 Kah attenuates neuronal apoptosis in the spinal cord of SCI mice. **A**: Immunofluorescent staining for NeuN and cleaved caspase3. **B**: Quantification analysis of the number of NeuN$^+$ cleaved caspase3$^+$ cells. **C**-**F**: Western blotting and quantitative analysis of protein expression levels. n=3 in each group. *P<0.05, **P<0.01.

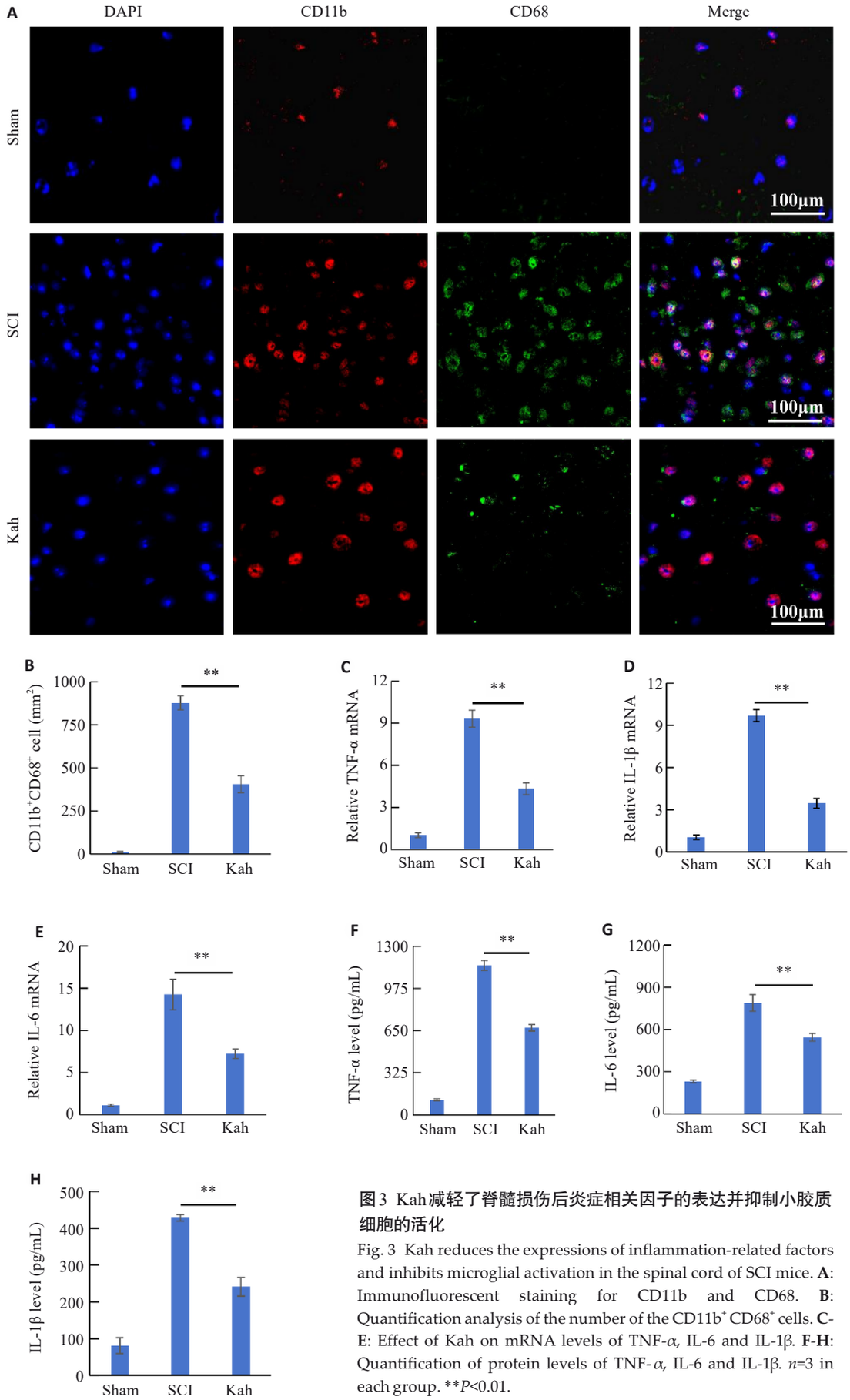

图3 Kah减轻了脊髓损伤后炎症相关因子的表达并抑制小胶质细胞的活化

Fig. 3 Kah reduces the expressions of inflammation-related factors and inhibits microglial activation in the spinal cord of SCI mice. **A**: Immunofluorescent staining for CD11b and CD68. **B**: Quantification analysis of the number of the $CD11b^+$ $CD68^+$ cells. **C-E**: Effect of Kah on mRNA levels of TNF-α, IL-6 and IL-1β. **F-H**: Quantification of protein levels of TNF-α, IL-6 and IL-1β. n=3 in each group. $^{**}P<0.01$.

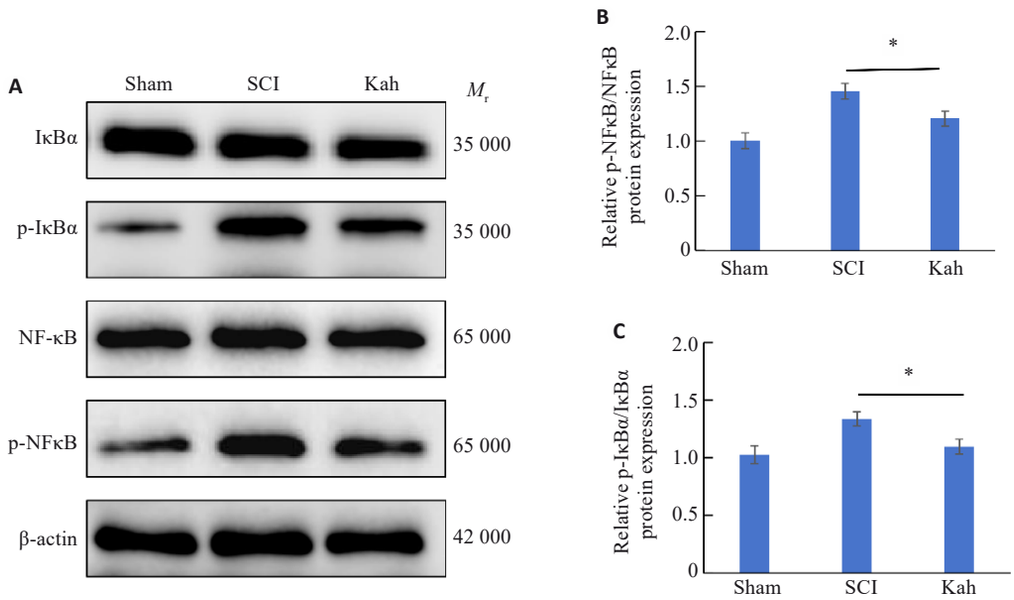

图4 Kah对SCI的保护性作用可能与NF-κB信号通路有关

Fig. 4 The protective effect of Kah in SCI mice may be related to the NF-κB signaling pathway. **A-C**: Proteins expressions of NF-κB, p-NF-κB, IκBα and p-IκBα in the spinal cord of SCI mice detected by Western blotting and quantitative analysis of protein levels. n=3 in each group. *P<0.05.

中的神经元保护作用，本研究通过SCI小鼠模型及LPS诱导的BV2/HT22神经元共培养体系进行验证。结果显示，Kah显著降低损伤脊髓组织及共培养神经元中凋亡相关蛋白cleaved caspase3和Bax的表达，同时上调抗凋亡蛋白Bcl-2的水平，该结果证实了Kah在SCI中的抗凋亡作用，也为其改善SCI后的神经功能提供了关键机制支持。有研究证实，神经元凋亡与小胶质细胞活化后产生的炎症因子密切相关[32]，已有证据表明Kah可对小胶质细胞的活化起到抑制作用[13]。基于此，本文探讨了Kah在SCI模型中对小胶质细胞的调控作用，结果显示，Kah干预可抑制小胶质细胞活化，并降低促炎因子TNF-α、IL-6及IL-1β的表达水平。这一发现首次证实，Kah在SCI中可通过靶向抑制小胶质细胞活化减轻神经炎症，进而改善神经元凋亡。

NF-κB与IκBα信号轴是调控炎症反应的核心枢纽，NF-κB通路的异常激活是SCI后炎症因子释放的关键因素[33]。据报道，SCI后NF-κB通路激活可引起小胶质细胞活化进而诱导神经炎症[34]。尽管已有研究表明Kah可通过抑制LPS激活的巨噬细胞中NF - κB信号通路发挥抗炎作用[25]。但其在SCI中是否通过该通路发挥作用尚未明确。因此，本研究首先在SCI小鼠模型中观察到Kah治疗可降低脊髓组织中p-IκBα与p-NF-κB的磷酸化水平，提示其可能通过阻断NF-κB信号轴发挥神经保护作用。为验证这一机制，本研究在LPS诱导的BV2细胞模型中发现，Kah干预可抑制IκBα与NF-κB的磷酸化激活。更重要的是，通过NF-κB特异性激活剂PMA构建的rescue实验显示，Kah可逆转PMA诱导的BV2细胞活化及神经元凋亡。这一结果证明：Kah对SCI后继发性炎症损伤的改善作用，至少部分通过抑制NF-κB信号通路实现。这揭示了Kah通过靶向NF-κB通路调控神经炎症的全新作用模式，进一步完善了其在神经领域的研究体系。

本研究证实，Kah通过抑制小胶质细胞活化，减少SCI后神经元凋亡，从而发挥神经保护作用。其作用机制可能主要涉及对NF-κB信号通路的调控。这些发现不仅表明了Kah治疗SCI的分子机制，也凸显了其作为天然神经保护剂的良好临床转化潜力，为SCI治疗提供了实验依据与新思路。

虽然本文系统阐明了Kah作用于SCI的分子机制，但仍存在以下局限性。首先，由于SCI小鼠的修复能力与人类存在显著差异，其修复机制及药物反应性可能无法完全模拟临床患者，未来需结合其他动物模型以提高研究结论的临床相关性；其次，研究主要聚焦于Kah通过改善炎症反应促进SCI小鼠的运动恢复，但神经功能修复是多系统参与的复杂过程，该过程也可能涉及到其他途径；最后，本研究仅探讨了Kah通过调控NF-κB信号轴发挥神经保护效应，而SCI后小胶质活化涉及多条通路交互作用，仍需后续实验深入验证。

综上所述，本研究表明Kah可通过抑制NF-κB通路调控小胶质细胞活化，抑制炎症因子的产生，进而减少SCI后神经元凋亡，最终促进SCI小鼠运动功能恢复。

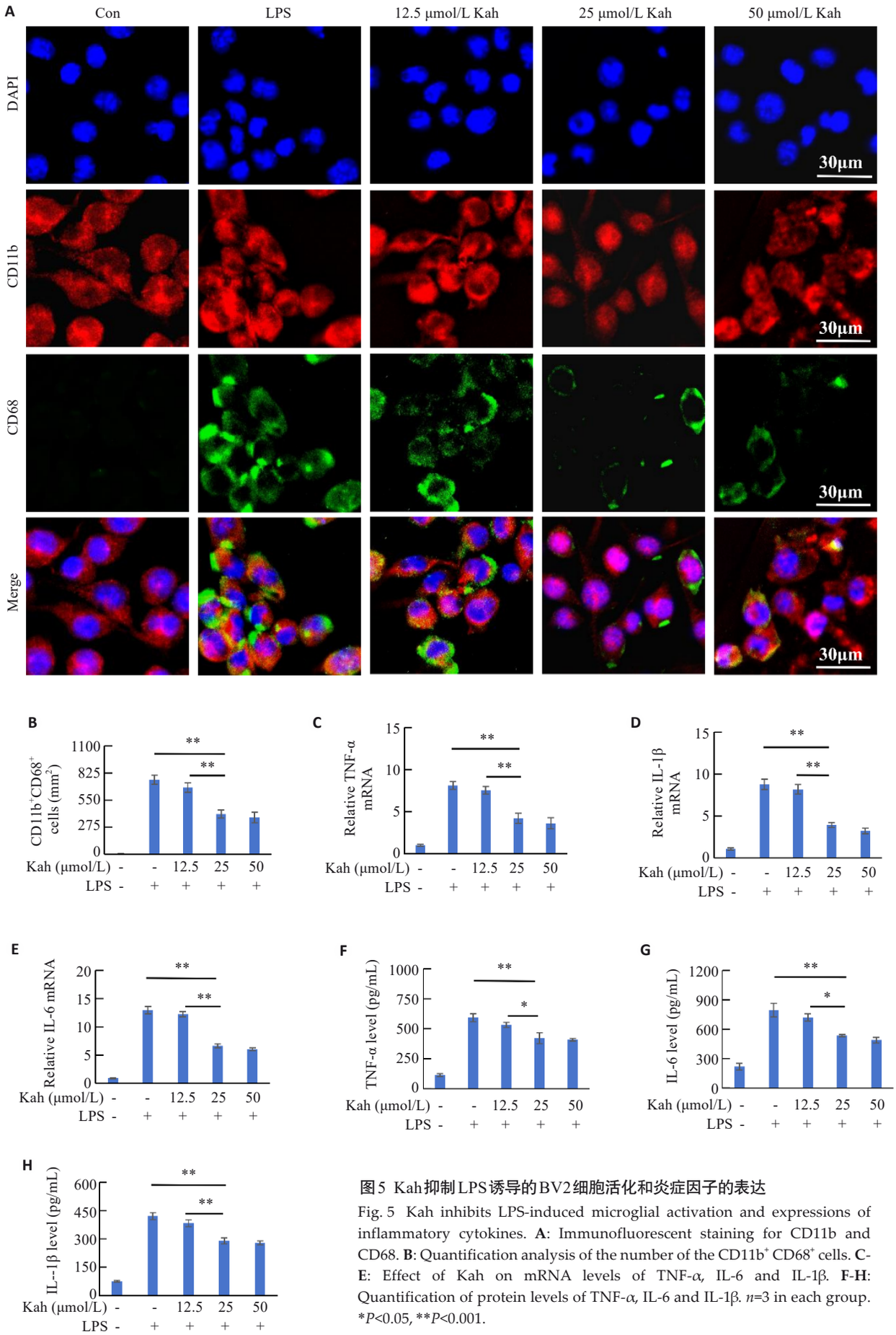

图5 Kah抑制LPS诱导的BV2细胞活化和炎症因子的表达

Fig. 5 Kah inhibits LPS-induced microglial activation and expressions of inflammatory cytokines. **A**: Immunofluorescent staining for CD11b and CD68. **B**: Quantification analysis of the number of the $CD11b^+$ $CD68^+$ cells. **C-E**: Effect of Kah on mRNA levels of TNF-α, IL-6 and IL-1β. **F-H**: Quantification of protein levels of TNF-α, IL-6 and IL-1β. n=3 in each group. *P<0.05, **P<0.001.

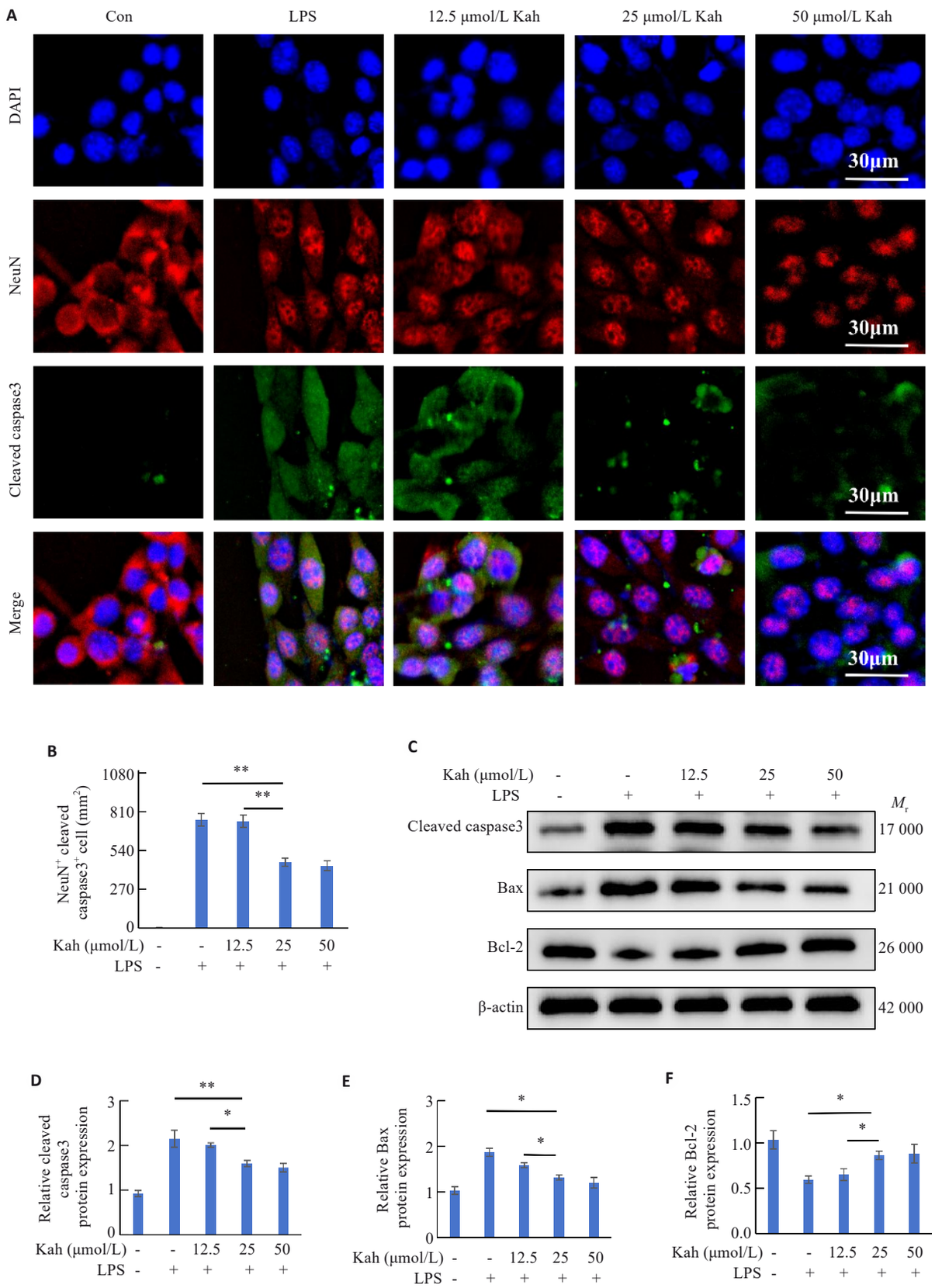

图6 Kah减轻BV2细胞活化引起的神经元凋亡

Fig. 6 Kah attenuates neuronal apoptosis caused by microglial activation. **A**: Immunofluorescent staining for NeuN and cleaved caspase-3. **B**: Quantification analysis of the number of the NeuN$^+$/cleaved caspase-3$^+$ cells. **C**-**F**: Western blotting analysis and quantitative analysis of protein expression levels. n=3 in each group. *P<0.05, **P<0.001.

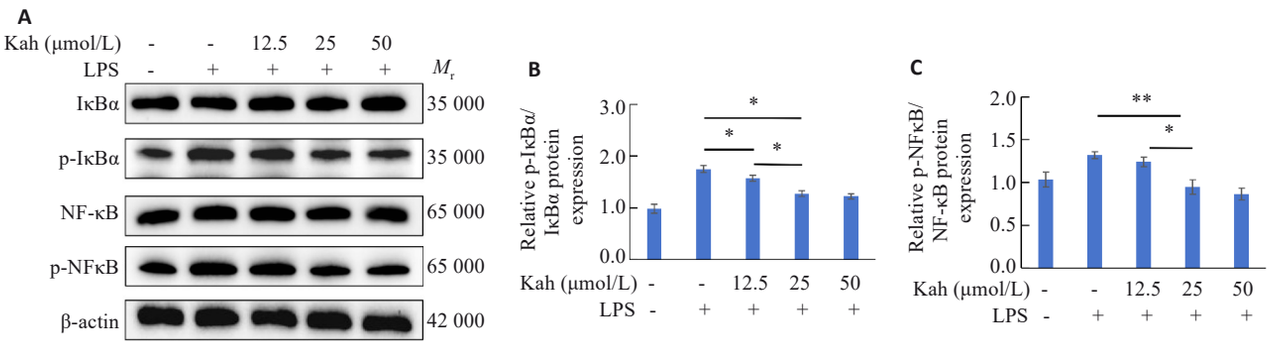

图7 Kah抑制NF-κB信号通路

Fig.7 Kah inhibits the NF-kB signaling pathway. **A**-**C**: Proteins expressions of NF-κB, p-NF-κB, IκBα and p-IκBα in BV2 cells detected by Western blotting and quantitative analysis of protein levels. n=3 in each group. *P<0.05, **P<0.001.

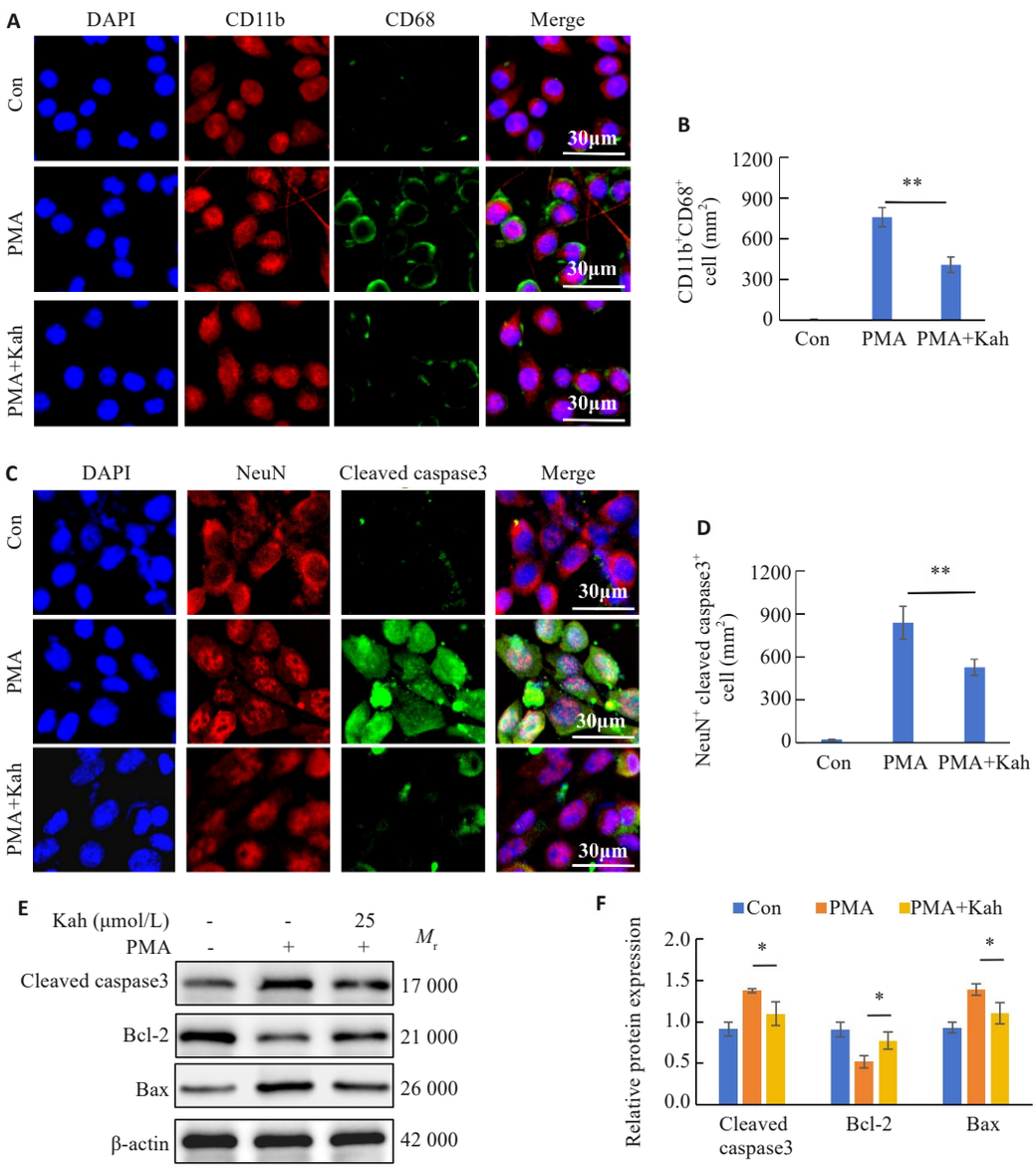

图8 Kah通过抑制NF-κB通路减轻BV2细胞活化及神经元凋亡

Fig. 8 Kah attenuates microglial activation and neuronal apoptosis by inhibiting the NF-κB pathway. **A**: Immunofluorescent staining for CD11b and CD68. **B**: Quantification analysis of the number of $CD11b^+CD68^+$ cells. **C**: Immunofluorescent staining for NeuN and cleaved caspase3. **D**: Quantification analysis of the number of the $NeuN^+$cleaved $caspase3^+$ cells. **E**, **F**: Western blotting and quantitative analysis of protein expression levels. n=3 in each group. *P<0.05, **P<0.001.

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献：

[1] Martynyuk T, Ricard J, Bracchi-Ricard V, et al. Mitigating sTNF/TNFR1 activation on VGluT2+spinal cord interneurons improves immune function after mid-thoracic spinal cord injury[J]. Brain Behav Immun, 2025, 123: 633-43.

[2] Anjum A, Yazid MD, Fauzi Daud M, et al. Spinal cord injury: pathophysiology, multimolecular interactions, and underlying recovery mechanisms[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(20): E7533.

[3] Ma H, Wang C, Han L, et al. Tofacitinib promotes functional recovery after spinal cord injury by regulating microglial polarization *via* JAK/STAT signaling pathway[J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(15): 4865-82.

[4] Kunnumakkara AB, Shabnam B, Girisa S, et al. Inflammation, NF-κB, and chronic diseases: how are they linked? [J]. Crit Rev Immunol, 2020, 40(1): 1-39.

[5] Zhao HS, Mei XF, Yang DF, et al. Resveratrol inhibits inflammation after spinal cord injury *via* SIRT-1/NF-κB signaling pathway[J]. Neurosci Lett, 2021, 762: 136151.

[6] Song C, Zhang K, Luo C, et al. Inhibiting the NF-κB/DRP1 axis affords neuroprotection after spinal cord injury *via* inhibiting polarization of pro-inflammatory microglia[J]. Front Biosci: Landmark Ed, 2024, 29(8): 307.

[7] Fei M, Li Z, Cao YW, et al. microRNA-182 improves spinal cord injury in mice by modulating apoptosis and the inflammatory response *via* IKKβ/NF-κB[J]. Lab Investig, 2021, 101(9): 1238-53.

[8] Wang H, Lin F, Wu Y, et al. Carrier-free nanodrug based on co-assembly of methylprednisolone dimer and rutin for combined treatment of spinal cord injury[J]. ACS Nano, 2023, 17(13): 12176-87.

[9] Baroudi M, Rezk A, Daher M, et al. Management of traumatic spinal cord injury: a current concepts review of contemporary and future treatment[J]. Injury, 2024, 55(6): 111472.

[10] Socała K, Szopa A, Serefko A, et al. Neuroprotective effects of coffee bioactive compounds: a review[J]. Int J Mol Sci, 2020, 22(1): E107.

[11] Eldesouki S, Qadri R, Abu Helwa R, et al. Recent updates on the functional impact of kahweol and cafestol on cancer[J]. Molecules, 2022, 27(21): 7332.

[12] Seo HY, Kim MK, Lee SH, et al. Kahweol ameliorates the liver inflammation through the inhibition of NF-κB and STAT3 activation in primary kupffer cells and primary hepatocytes[J]. Nutrients, 2018, 10(7): E863.

[13] Lee HF, Lin JS, Chang CF. Acute kahweol treatment attenuates traumatic brain injury neuroinflammation and functional deficits[J]. Nutrients, 2019, 11(10): E2301.

[14] Hwang YP, Jeong HG. The coffee diterpene kahweol induces heme oxygenase-1 *via* the PI3K and p38/Nrf2 pathway to protect human dopaminergic neurons from 6-hydroxydopamine-derived oxidative stress[J]. FEBS Lett, 2008, 582(17): 2655-62.

[15] Xue MT, Sheng WJ, Song X, et al. Atractylenolide III ameliorates spinal cord injury in rats by modulating microglial/macrophage polarization[J]. CNS Neurosci Ther, 2022, 28(7): 1059-71.

[16] Duan FX, Shi YJ, Chen J, et al. Neuroprotective effects of P7C3 against spinal cord injury in rats[J]. Exp Biol Med: Maywood, 2019, 244(18): 1680-7.

[17] Kim JY, Leem J, Kim GM. Kahweol protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice through inhibiting oxidative stress, hepatocyte death, and inflammation[J]. Biomed Res Int, 2022, 2022: 8121124.

[18] Kim JY, Jo J, Leem J, et al. Kahweol ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury through pleiotropic effects in mice[J]. Biomedicines, 2020, 8(12): E572.

[19] Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, et al. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains[J]. J Neurotrauma, 2006, 23(5): 635-59.

[20] Xu YB, Geng ZJ, Sun Y, et al. Complanatuside A improves functional recovery after spinal cord injury through inhibiting JNK signaling-mediated microglial activation[J]. Eur J Pharmacol, 2024, 965: 176287.

[21] Liu S, Wu Q, Wang LY, et al. Coordination function index: a novel indicator for assessing hindlimb locomotor recovery in spinal cord injury rats based on catwalk gait parameters[J]. Behav Brain Res, 2024, 459: 114765.

[22] Jiang D, Gong F, Ge X, et al. Neuron-derived exosomes-transmitted miR-124-3p protect traumatically injured spinal cord by suppressing the activation of neurotoxic microglia and astrocytes[J]. J Nanobiotechnology, 2020, 18(1): 105.

[23] Lei P, Li Z, Hua Q, et al. Ursolic acid alleviates neuroinflammation after intracerebral hemorrhage by mediating microglial pyroptosis *via* the NF-κB/NLRP3/GSDMD pathway[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(19): 14771.

[24] Zhang Y, Jia J. Betaine mitigates amyloid-β-associated neuroinflammation by suppressing the NLRP3 and NF-κB signaling pathways in microglial cells[J]. J Alzheimers Dis, 2023, 94(s1): S9-19.

[25] Shen T, Park YC, Kim SH, et al. Nuclear factor-kappaB/signal transducers and activators of transcription-1-mediated inflammatory responses in lipopolysaccharide-activated macrophages are a major inhibitory target of kahweol, a coffee diterpene[J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(7): 1159-64.

[26] Li G, Fu T, Wang W, et al. Pretreatment with kahweol attenuates sepsis-induced acute lung injury *via* improving mitochondrial homeostasis in a CaMKKII/AMPK-dependent pathway[J]. Mol Nutr Food Res, 2023, 67(19): e2300083.

[27] Liu H, Zhang J, Xu X, et al. SARM1 promotes neuroinflammation and inhibits neural regeneration after spinal cord injury through NF-κB signaling[J]. Theranostics, 2021, 11(9): 4187-206.

[28] Ryu Y, Ogata T, Nagao M, et al. The swimming test is effective for evaluating spasticity after contusive spinal cord injury[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0171937.

[29] Metz GAS, Merkler D, Dietz V, et al. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats[J]. Brain Res, 2000, 883(2): 165-77.

[30] Davidson LT, Evans MC. Congenital and acquired spinal cord injury and dysfunction[J]. Pediatr Clin North Am, 2023, 70(3): 461-81.

[31] de Oliveira MR, de Souza ICC, Fürstenau CR. Mitochondrial protection promoted by the coffee diterpene kahweol in methylglyoxal-treated human neuroblastoma SH-SY5Y cells[J]. Neurotox Res, 2020, 37(1): 100-10.

[32] Meng TY, Zhang YF, Huang J, et al. Rubusoside mitigates neuroinflammation and cellular apoptosis in Parkinson's disease, and alters gut microbiota and metabolite composition[J]. Phytomedicine, 2024, 124: 155309.

[33] Mitchell JP, Carmody RJ. Chapter two NF-κB and the transcriptional control of inflammation[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2018, 335: 41-84.

[34] Wei J, Li T, Lin S, et al. Dihydrotestosterone reduces neuroinflammation in spinal cord injury through NF-κB and MAPK pathway[J]. Cell Mol Biol: Noisy-le-grand, 2024, 70(1): 213-8.

（编辑：林 萍）