

DOI:10.20283/j.cnki.1006-5687.2025.01.01

· 实验研究 ·

依达拉奉对缺氧诱导脑血管内皮细胞损伤的影响及机制研究

辛卫云¹, 曹利华²(¹ 河南省中医院/河南中医药大学第二附属医院, 河南郑州 450011;² 河南中医药大学中医药科学院, 河南郑州 450046)

摘要: **目的** 明确依达拉奉调控核因子 κB (NF- κB) 信号通路对缺氧诱导脑血管内皮细胞损伤的影响。**方法** 分离大鼠脑血管内皮细胞, 分成 Control、Model (缺氧处理)、Edaravone-10 $\mu\text{mol/L}$ (缺氧和 10 $\mu\text{mol/L}$ 依达拉奉处理)、Edaravone-20 $\mu\text{mol/L}$ (缺氧和 20 $\mu\text{mol/L}$ 依达拉奉处理)、Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$ (缺氧和 40 $\mu\text{mol/L}$ 依达拉奉处理)、Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$ +PMA (缺氧和 40 $\mu\text{mol/L}$ 依达拉奉、NF- κB 信号激活剂 PMA 处理) 组, 以噻唑蓝 (MTT) 方法检测各组细胞增殖活性变化, 运用流式细胞术分析各组细胞凋亡水平变化, 试剂盒检测活性氧 (ROS)、丙二醛 (MDA)、乳酸脱氢酶 (LDH)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 水平, Western blot 法检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (Caspase)-3、裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (C-Caspase)-3、Caspase-9、C-Caspase-9、p65 蛋白表达。**结果** 与 Control 组比较, Model 组脑血管内皮细胞凋亡水平增加, 细胞增殖活性降低, 细胞中 C-Caspase-3、C-Caspase-9、p65、ROS、MDA、LDH 表达水平升高, Caspase-3、Caspase-9、SOD、GSH-Px 表达水平降低。与 Model 组比较, Edaravone-10 $\mu\text{mol/L}$ 、Edaravone-20 $\mu\text{mol/L}$ 、Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$ 组脑血管内皮细胞凋亡水平逐渐降低, 细胞增殖活性逐渐升高, 细胞中 C-Caspase-3、C-Caspase-9、p65、ROS、MDA、LDH 表达水平逐渐降低, Caspase-3、Caspase-9、SOD、GSH-Px 表达水平逐渐升高。与 Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$ +PMA 组脑血管内皮细胞增殖活性降低, 细胞凋亡率升高, C-Caspase-3、C-Caspase-9、p65、ROS、MDA、LDH 表达增多, Caspase-3、Caspase-9、SOD、GSH-Px 表达降低。**结论** 依达拉奉通过抑制 NF- κB 信号减轻缺氧诱导脑血管内皮细胞损伤。

关键词: 依达拉奉; NF- κB 信号; 脑血管内皮细胞; 缺氧**中图分类号:** R743

Effect and mechanism of edaravone on cerebral vascular endothelial cell damage induced by hypoxia

XIN Weiyun¹, CAO Lihua²(¹ Henan Hospital of Traditional Chinese Medicine/The Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou Henan 450011, China; ² Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou Henan 450046, China)

ABSTRACT: Objective To clarify the effect of edaravone-regulated nuclear factor kappa-B (NF- κB) signaling pathway on hypoxia-induced cerebral vascular endothelial cell injury. **Methods** Rat cerebral vascular endothelial cells were isolated and divided into Control, Model (hypoxia treatment), Edaravone-10 $\mu\text{mol/L}$ (hypoxia and 10 $\mu\text{mol/L}$ edaravone treatment), Edaravone-20 $\mu\text{mol/L}$ (hypoxia and 20 $\mu\text{mol/L}$ edaravone treatment), Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$ (hypoxia and 40 $\mu\text{mol/L}$ edaravone treatment), Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$ +PMA (hypoxia and 40 $\mu\text{mol/L}$ edaravone, NF- κB signal activator PMA treatment) group. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method was used to detect changes in cell proliferation activity in each group; flow cytometry was used to analyze changes in cell apoptosis; the kits were used to detect levels of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px); Western blot method was used to detect the expression of cysteine aspartic protease (Caspase)-3, cleaved cysteine aspartic protease (C-Caspase)-3, Caspase-9 and C-Caspase-9 and p65 protein. **Results** Compared with the Control group, the apoptosis level of cerebral vascular endothelial cells in the Model group increased, the cell proliferation activity decreased, the expression levels of C-Caspase-3, C-Caspase-9, p65, ROS, MDA and LDH were increased, the expression levels of Caspase-3, Caspase-9, SOD and GSH-Px were decreased. Compared with the Model group, in the Edaravone-10 $\mu\text{mol/L}$, Edaravone-20 $\mu\text{mol/L}$, Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$ groups, the apoptosis level of cerebral vascular endothelial cells gradually decreased, and the cell

作者简介: 辛卫云, E-mail: yxlu2003@163.com

proliferation activity gradually increased, the expression levels of C-Caspase-3, C-Caspase-9, p65, ROS, MDA and LDH gradually decreased, the expression levels of Caspase-3, Caspase-9, SOD and GSH-Px gradually increased. Compared with the Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$ group, in the Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$ +PMA group, the proliferation activity of cerebral vascular endothelial cells was reduced, the apoptosis rate was increased, and the expression of C-Caspase-3, C-Caspase-9, p65, ROS, MDA and LDH were increased, the expression of Caspase-3, Caspase-9, SOD and GSH-Px were decreased. **Conclusion** Edaravone reduces hypoxia-induced cerebral vascular endothelial cell damage by inhibiting NF- κ B signaling.

Key words: Edaravone; NF- κ B signaling; Cerebral vascular endothelial cells; Hypoxia

脑组织损伤在临床上极为常见,脑血管内皮细胞在脑组织损伤中发挥重要作用^[1]。在外界因素的刺激下,脑血管内皮细胞能够产生大量的活性氧(ROS),诱导氧化损伤和细胞凋亡,破坏脑组织完整结构,影响脑组织功能发挥^[2]。依达拉奉是一种氧自由基清除剂,临床上主要应用于脑水肿、神经功能障碍等神经系统疾病的治疗^[3]。有研究显示,依达拉奉对过氧化氢诱导的血管内皮细胞损伤有改善作用,其可以减少氧化应激引起的细胞凋亡^[4]。依达拉奉对缺血性脑损伤大鼠有治疗作用^[5]。目前尚未发现关于依达拉奉在缺氧诱导的脑血管内皮细胞损伤中的作用研究。研究显示,依达拉奉改善心脑血管系统疾病机制与信号转导通路有关^[6]。有实验表明,依达拉奉通过降低核因子 κ B(NF- κ B) 信号通路激活水平减轻脑缺氧大鼠氧化损伤;依达拉奉抑制脑出血大鼠细胞过度凋亡的同时抑制 NF- κ B 信号通路的激活;依达拉奉作用机制可能与 NF- κ B 信号通路有关^[7-8]。NF- κ B 是一个具有广泛作用的信号转导通路,参与炎症、细胞凋亡、氧化损伤、细胞衰老等多个生理活动的调节^[9]。研究显示,NF- κ B 在缺氧诱导的脑血管内皮细胞中过度激活,并且激活 NF- κ B 信号加重脑血管内皮细胞损伤^[10]。本实验旨在探讨依达拉奉调控 NF- κ B 信号对缺氧诱导的脑血管内皮细胞损伤的影响,以期以依达拉奉治疗缺氧诱导的脑血管损伤提供理论支撑。

1 资料与方法

1.1 材料 SD 大鼠,体质量 200 ~ 220 g,购自河南省实验动物中心,本研究遵循 3R 原则,且实验方案符合实验动物护理和使用指南;ROS 检测试剂盒购自武汉艾美捷科技有限公司;乳酸脱氢酶(LDH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒购自江苏艾迪生生物科技有限公司;依达拉奉购自中国药品生物制品检定所;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)-3、裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(C-Caspase)-3 抗体购自北京百奥莱博科技有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒购自上海康朗生物科技有限公司;Caspase-9、C-Caspase-9 抗体购自北京普利莱基因技术有限公司;p65 抗体购自美国 Abcam;丙二醛(MDA)含量检测试剂盒购自

北京索莱宝科技有限公司。

1.2 脑血管内皮细胞分离培养^[11] 脱颈处死大鼠,分离脑血管,用磷酸盐缓冲液(PBS)将脑组织洗涤 3 次,以眼科剪将组织剪碎,转移到离心管内,添加 2 g/L 的胶原酶,混合,放在 37℃ 水浴中充分消化 0.5 h。将消化以后的溶液用滤网过滤,3000 $\times g$ 离心 10 min。弃掉上清,留取细胞沉淀。添加含有 20% 胎牛血清的细胞培养液继续培养。

1.3 噻唑蓝(MTT)方法检测依达拉奉对脑血管内皮细胞增殖影响 脑血管内皮细胞种植到 96 孔板中,每个孔内 100 μL 的细胞培养液、5000 个细胞,同时在细胞内添加依达拉奉使其终浓度为 0、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$,常规培养 24 h,取出细胞培养板,分别添加 MTT 溶液,在 37℃ 继续培养 4 h。将上清溶液吸弃,添加 150 μL 的二甲基亚砜,孵育 10 min。转移到酶标仪上,检测 490 nm 的光密度(OD)值。

1.4 细胞分组 脑血管内皮细胞分成 Control、Model、Edaravone-10 $\mu\text{mol/L}$ 、Edaravone-20 $\mu\text{mol/L}$ 、Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$ 组,处理方法如下:(1) Control 组正常培养;(2) Model 组给予缺氧条件(95% 氮气、5% CO_2 、1% 氧气)刺激;(3) Edaravone-10 $\mu\text{mol/L}$ 组给予缺氧条件(95% 氮气、5% CO_2 、1% 氧气)和 10 $\mu\text{mol/L}$ 的依达拉奉刺激;(4) Edaravone-20 $\mu\text{mol/L}$ 组给予缺氧条件(95% 氮气、5% CO_2 、1% 氧气)和 20 $\mu\text{mol/L}$ 的依达拉奉刺激;(5) Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$ 组给予缺氧条件(95% 氮气、5% CO_2 、1% 氧气)和 40 $\mu\text{mol/L}$ 的依达拉奉刺激。各组细胞培养 24 h 以后,按照 1.3 中 MTT 方法检测细胞增殖活性的变化。

1.4.1 流式细胞术检测细胞凋亡 分别用 PBS 将 Control、Model、Edaravone-10 $\mu\text{mol/L}$ 、Edaravone-20 $\mu\text{mol/L}$ 、Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞反复洗涤 2 次,然后将细胞悬浮在 PBS 中,调整细胞浓度为 2×10^6 个/mL,每个样品取 1 mL 细胞溶液,离心,留取细胞沉淀,添加 300 μL 的结合缓冲液,继续添加 5 μL 的碘化丙锭(PI)和膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)。在用流式细胞仪测定以前,再添加 200 μL 的结合缓冲液。

1.4.2 ROS、MDA、LDH、SOD、GSH-Px 水平检测 收集 Control、Model、Edaravone-10 $\mu\text{mol/L}$ 、Edaravone-20 $\mu\text{mol/L}$ 、Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞,按照试剂盒说明书检测 ROS、MDA、LDH、SOD、GSH-Px 水平。

1.4.3 Western blot 检测 Caspase-3、C-Caspase-3、Caspase-9、C-Caspase-9、p65 蛋白表达 分别在 Control、Model、Edaravone-10 $\mu\text{mol/L}$ 、Edaravone-20 $\mu\text{mol/L}$ 、Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞中添加放射免疫沉淀测定 (RIPA) 溶液,放在冰上,充分裂解。4℃、12000 $\times g$ 离心 10 min,将上清溶液转移至干净的 EP 管中,经过二辛可宁酸 (BCA) 方法测定蛋白浓度以后,用于后续 Western blot 操作。在蛋白中添加 2 $\times$ 上样缓冲液,放在 100℃煮沸 5 min。按照每个孔中添加 30 μg 蛋白样品进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),本次实验采用 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶行 SDS-PAGE。首先设置 70 V 的电压电泳,观察溴酚蓝指示剂将要进入分离胶时,把电压设置为 120 V 继续电泳,等到指示剂已经进入凝胶的下端边缘时,把电源关闭。将凝胶放在转膜液内平衡 20 min。裁剪硝酸纤维素膜 (NC),浸泡在甲醇中孵育 15 s,置于转膜液中备用。将转膜槽装置放在冰上,300 mA 电流进行转膜,2 h 后,关闭电源,取出 NC 膜。把 NC 膜放在封闭液 (含 5% 牛血清白蛋白的 TBST) 内,摇床结合 2 h。把 NC 膜放在稀释以后的一抗内,在 4℃孵育过夜。Caspase-3、C-Caspase-3、Caspase-9、C-Caspase-9、p65 一抗均按照 1:600 稀释。把 NC 膜放在二抗溶液内,室温结合 2 h。配制电化学发光溶液,滴加到 NC 膜上,利用 Quantity One 分析条带的灰度值。GAPDH 为内参,以灰度值分析目的蛋白相对表达水平。

1.5 激活 NF- κB 信号通路对依达拉奉影响脑血管内皮细胞的作用检测 脑血管内皮细胞培养在含有 40 $\mu\text{mol/L}$ 的依达拉奉、1 $\mu\text{mol/L}$ 的 NF- κB 信号通路激活剂 PMA 细胞培养液内,同时给予缺氧条件 (95% 氮气、5% CO_2 、1% 氧气) 处理,记为 Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$ +PMA 组,以 Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$ 组为参照,分析细胞增殖 (步骤按照 1.3 进行)、凋亡 (步骤按照 1.4.1 进行) 和细胞中 Caspase-3、C-Caspase-3、Caspase-9、C-Caspase-9、p65

蛋白表达 (步骤按照 1.4.3 进行) 以及 MDA、SOD、ROS 水平 (步骤按照 1.4.2 进行)。

1.6 统计学方法 数据经过 SPSS 21.0 软件分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,多组差异比较用单因素方差, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 依达拉奉对脑血管内皮细胞增殖的影响 结果见表 1,与 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较,10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 依达拉奉作用后的脑血管内皮细胞增殖活性没有变化,而 80 $\mu\text{mol/L}$ 依达拉奉作用后的脑血管内皮细胞增殖活性明显降低。选取对细胞增殖活性没有影响的 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 依达拉奉进行后续研究。

表 1 不同浓度的依达拉奉刺激后脑血管内皮细胞增殖活性比较 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

依达拉奉作用浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	增殖活性 (OD 值)
0	0.75 $\pm$ 0.07
10	0.74 $\pm$ 0.06
20	0.73 $\pm$ 0.08
40	0.71 $\pm$ 0.06
80	0.60 $\pm$ 0.05 *
<i>F</i>	7.993
<i>P</i>	<0.001

与 0 $\mu\text{mol/L}$ 相比, * $P < 0.05$ 。OD: 光密度

2.2 依达拉奉对缺氧诱导的脑血管内皮细胞凋亡的影响

结果见图 1 和表 2,与 Control 组相比,Model 组脑血管内皮细胞凋亡水平增加,细胞增殖活性降低,细胞中 C-Caspase-3、C-Caspase-9 表达水平升高, Caspase-3、Caspase-9 表达水平降低。与 Model 组相比, Edaravone-10 $\mu\text{mol/L}$ 、Edaravone-20 $\mu\text{mol/L}$ 、Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$ 组脑血管内皮细胞凋亡水平逐渐降低,细胞增殖活性逐渐升高,细胞中 C-Caspase-3、C-Caspase-9 表达水平逐渐降低, Caspase-3、Caspase-9 表达水平升高。提示依达拉奉抑制缺氧诱导的脑血管内皮细胞凋亡。

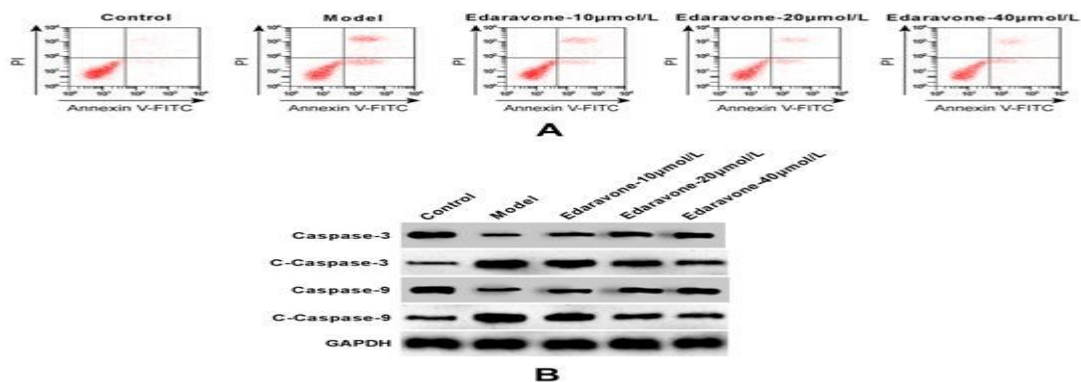


图 1 依达拉奉刺激后缺氧条件下脑血管内皮细胞凋亡以及细胞中 C-Caspase-3、C-Caspase-9 蛋白表达情况 ($n = 9$)。A: 以流式细胞术检测脑血管内皮细胞凋亡; B: 以 Western blot 方法检测脑血管内皮细胞中 Caspase-3、C-Caspase-3、Caspase-9、C-Caspase-9 蛋白表达。Caspase: 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶; C-Caspase: 裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

表 2 依达拉奉刺激后缺氧条件下脑血管内皮细胞增殖活性、凋亡率和细胞中 Caspase-3、C-Caspase-3、Caspase-9、C-Caspase-9 蛋白水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	增殖活性(OD 值)	凋亡率(%)	Caspase-3	C-Caspase-3	Caspase-9	C-Caspase-9
Control	0.74±0.09	6.52±5.47	0.76±0.08	0.25±0.02	0.92±0.11	0.30±0.03
Model	0.42±0.04 [*]	29.58±2.14 [*]	0.14±0.02 [*]	0.89±0.09 [*]	0.34±0.02 [*]	0.92±0.10 [*]
Edaravone-10 μmol/L	0.49±0.02 [#]	20.32±1.78 [#]	0.28±0.04 [#]	0.70±0.05 [#]	0.49±0.04 [#]	0.65±0.05 [#]
Edaravone-20 μmol/L	0.58±0.04 ^{#&}	15.06±1.12 ^{#&}	0.43±0.05 ^{#&}	0.50±0.05 ^{#&}	0.68±0.05 ^{#&}	0.42±0.03 ^{#&}
Edaravone-40 μmol/L	0.69±0.05 ^{#&△}	11.65±1.71 ^{#&△}	0.62±0.06 ^{#&△}	0.34±0.04 ^{#&△}	0.86±0.07 ^{#&△}	0.31±0.02 ^{#&△}
F	56.504	83.552	194.214	103.930	125.205	213.827
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与 Control 组相比,^{*} $P<0.05$;与 Model 组相比,[#] $P<0.05$;与 Edaravone-10 μmol/L 组相比,[&] $P<0.05$;与 Edaravone-20 μmol/L 组相比,[△] $P<0.05$

2.3 依达拉奉对缺氧诱导的脑血管内皮细胞氧化损伤的影响 结果见表 3,与 Control 组比较,Model 组脑血管内皮细胞 MDA、ROS、LDH 水平升高,SOD、GSH-Px 水平降低。与 Model 组相比,Edara-

vone-10 μmol/L、Edaravone-20 μmol/L、Edaravone-40 μmol/L 组脑血管内皮细胞 ROS、MDA、LDH 水平逐渐降低,SOD、GSH-Px 水平逐渐升高。提示依达拉奉抑制缺氧诱导的脑血管内皮细胞氧化损伤。

表 3 依达拉奉刺激后缺氧条件下脑血管内皮细胞 ROS、MDA、LDH、SOD、GSH-Px 水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	ROS(相对荧光强度)	MDA(mmol/g)	LDH(U/L)	SOD(U/mg)	GSH-Px(U/mg)
Control	1.00±0.09	1.56±0.14	24.16±1.22	2.84±0.12	1.12±0.08
Model	2.15±0.16 [*]	4.78±0.13 [*]	96.52±7.53 [*]	0.56±0.04 [*]	0.32±0.03 [*]
Edaravone-10 μmol/L	1.72±0.12 [#]	3.62±0.11 [#]	83.35±5.23 [#]	0.91±0.08 [#]	0.49±0.05 [#]
Edaravone-20 μmol/L	1.40±0.11 ^{#&}	2.48±0.10 ^{#&}	62.23±3.17 ^{#&}	1.42±0.10 ^{#&}	0.68±0.05 ^{#&}
Edaravone-40 μmol/L	1.15±0.13 ^{#&△}	1.85±0.12 ^{#&△}	32.58±3.56 ^{#&△}	2.13±0.14 ^{#&△}	0.93±0.10 ^{#&△}
F	124.337	1097.026	407.335	736.589	210.814
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与 Control 组相比,^{*} $P<0.05$;与 Model 组相比,[#] $P<0.05$;与 Edaravone-10 μmol/L 组相比,[&] $P<0.05$;与 Edaravone-20 μmol/L 组相比,[△] $P<0.05$ 。ROS:活性氧;MDA:丙二醛;LDH:乳酸脱氢酶;SOD:超氧化物歧化酶;GSH-Px:谷胱甘肽过氧化物酶。

2.4 依达拉奉对缺氧诱导的脑血管内皮细胞中 NF-κB 信号通路影响 结果见图 2 和表 4,与 Control 组比较,Model 组脑血管内皮细胞 p65 蛋白水平升高。与 Model 组相比,Edaravone-10 μmol/L、Edaravone-20 μmol/L、Edaravone-40 μmol/L 组脑血管内皮细胞 p65 蛋白水平逐渐降低。可见依达拉奉抑制缺氧诱导的脑血管内皮细胞中 NF-κB 信号通路激活。

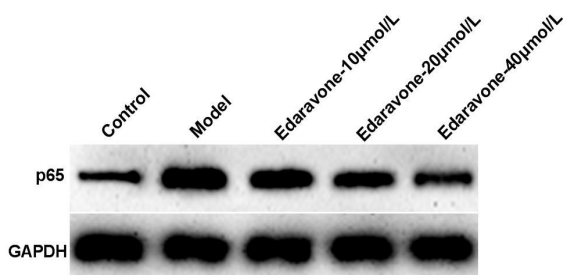


图 2 Western blot 方法检测依达拉奉刺激后缺氧条件下脑血管内皮细胞中 p65 蛋白表达变化($n=9$)

表 4 依达拉奉刺激后缺氧条件下脑血管内皮细胞 p65 蛋白水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	p65 蛋白
Control	0.29±0.03
Model	0.86±0.08 [*]
Edaravone-10 μmol/L	0.63±0.06 [#]
Edaravone-20 μmol/L	0.41±0.04 ^{#&}
Edaravone-40 μmol/L	0.32±0.03 ^{#&△}
F	194.004
P	<0.001

与 Control 组相比,^{*} $P<0.05$;与 Model 组相比,[#] $P<0.05$;与 Edaravone-10 μmol/L 组相比,[&] $P<0.05$;与 Edaravone-20 μmol/L 组相比,[△] $P<0.05$ 。

2.5 NF-κB 信号通路激活剂对脑血管内皮细胞中 NF-κB 信号通路的影响 结果见图 3,与 Edaravone-40 μmol/L 组比较,Edaravone-40 μmol/L+PMA 组脑血管内皮细胞 p65 蛋白水平升高(0.76 ± 0.09 vs $0.34\pm 0.05, t=12.238, P<0.001$)。

2.6 激活 NF-κB 信号通路对依达拉奉影响脑血管内皮细胞增殖、凋亡和氧化损伤的逆转作用 结果见图

4、表 5 和表 6,与 Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$ +PMA 组脑血管内皮细胞增殖活性降低,细胞凋亡率升高,C-Caspase-3、C-Caspase-9、ROS、MDA、LDH 表达水平升高,Caspase-3、Caspase-9、SOD、GSH-Px 表达水平降低。

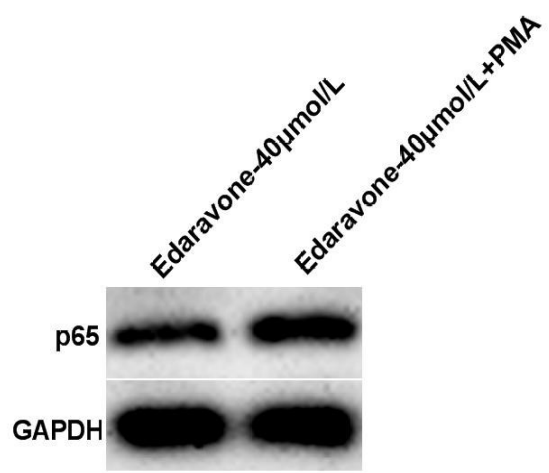


图 3 Western blot 方法检测 NF- κ B 信号激活剂 PMA 对脑血管内皮细胞中 p65 蛋白表达影响 ($n=9$)。NF- κ B:核因子 κ B

表 5 激活 NF- κ B 信号和依达拉奉刺激后缺氧条件下脑血管内皮细胞增殖活性、凋亡率和细胞中 Caspase-3、C-Caspase-3、Caspase-9、C-Caspase-9 蛋白水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	增殖活性(OD 值)	凋亡率(%)	Caspase-3	C-Caspase-3	Caspase-9	C-Caspase-9
Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$	0.68 ± 0.06	10.85 ± 1.02	0.64 ± 0.07	0.33 ± 0.02	0.83 ± 0.05	0.32 ± 0.03
Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$ +PMA	0.56 ± 0.05	18.63 ± 1.74	0.36 ± 0.03	0.65 ± 0.06	0.53 ± 0.04	0.64 ± 0.05
<i>t</i>	4.609	11.572	11.030	15.179	14.056	16.464
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 6 激活 NF- κ B 信号和依达拉奉刺激后缺氧条件下脑血管内皮细胞 ROS、MDA、LDH、SOD、GSH-Px 水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	ROS(相对荧光强度)	MDA(mmol/g)	LDH(U/L)	SOD(U/mg)	GSH-Px(U/mg)
Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$	1.00 ± 0.08	1.82 ± 0.14	30.21 ± 2.18	2.11 ± 0.16	0.95 ± 0.12
Edaravone-40 $\mu\text{mol/L}$ +PMA	1.67 ± 0.14	3.41 ± 0.25	76.36 ± 6.16	1.25 ± 0.13	0.54 ± 0.04
<i>t</i>	12.465	16.647	21.118	12.515	9.724
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

ROS:活性氧;MDA:丙二醛;LDH:乳酸脱氢酶;SOD:超氧化物歧化酶;GSH-Px:谷胱甘肽过氧化物酶

3 讨论

缺氧诱导脑血管内皮细胞中 ROS 水平升高,细胞内大量的 ROS 不能被及时清除,导致过量的 ROS 将细胞内的脂质过氧化,引起氧化损伤^[12]。MDA 是脂质过氧化的产物,其表达水平升高后,氧化损伤程度加重^[13]。ROS 水平过度增加与抗氧化酶 SOD 的活性有关,SOD 活性越高,ROS 水平降

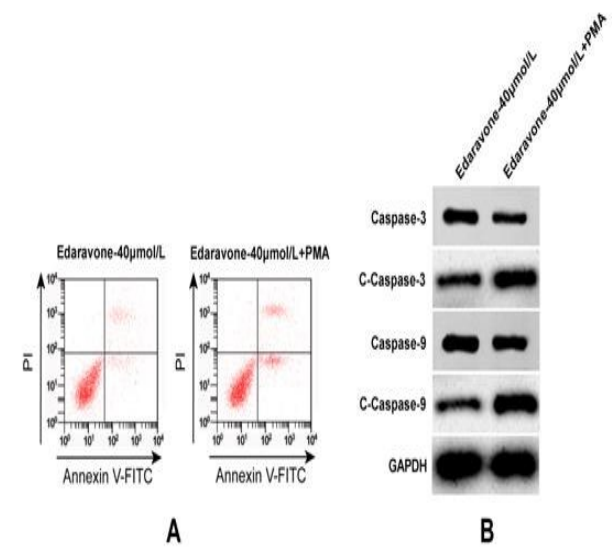


图 4 激活 NF- κ B 信号对依达拉奉影响脑血管内皮细胞凋亡以及细胞中 C-Caspase-3、C-Caspase-9 蛋白表达影响。A:以流式细胞术检测脑血管内皮细胞凋亡;B:以 Western blot 方法检测脑血管内皮细胞中Caspase-3、C-Caspase-3、Caspase-9、C-Caspase-9蛋白表达

低^[14]。另外,ROS 还能够激活细胞凋亡途径,诱导细胞凋亡发生^[15]。LDH 在脑缺血损伤时会释放到血液中,增加乳酸的积累^[16]。GSH-Px 是一种天然抗氧化酶,可清除细胞内 ROS。Caspase 蛋白家族成员被活化后能够诱导细胞凋亡发生,并且不同的 Caspase 成员在凋亡级联反应中的作用不同,例如,Caspase-3 位于凋亡级联反应的下游,其被活化后形成的 C-Caspase-3 被认为是细胞凋亡的标志;

Caspase-9 位于凋亡级联反应的上游,其活化后能够加快凋亡级联反应的激活,诱导细胞凋亡发生^[17-18]。本次实验显示,缺氧刺激后的脑血管内皮细胞增殖活性降低,细胞凋亡水平增加,细胞中 C-Caspase-3、C-Caspase-9、ROS、MDA、LDH 表达水平升高,Caspase-3、Caspase-9、SOD、GSH-Px 表达水平降低,表明缺氧诱导脑血管内皮细胞损伤,加快细胞凋亡和氧化损伤,提示成功构建了缺氧脑血管内皮细胞损伤模型。

依达拉奉化学结构是 3-甲基-1-苯基-2-吡啶-5-酮,其通透性良好,能够清除氧自由基,依达拉奉可通过抑制脂质过氧化、保护内皮细胞、抑制血管痉挛等方法发挥神经保护作用^[19]。以前的研究显示,依达拉奉对脑出血、脑缺血损伤具有改善作用,依达拉奉降低脑组织中细胞凋亡水平,减轻氧化损伤,改善脑水肿^[7-8]。依达拉奉可降低过氧化氢诱导的血管内皮细胞损伤,提高 SOD 活性,降低 MDA 含量^[4]。本次实验结果显示,依达拉奉处理后的缺氧脑血管内皮细胞增殖活性升高,细胞凋亡率降低,细胞中 C-Caspase-3、C-Caspase-9、ROS、MDA、LDH 表达减少,Caspase-3、Caspase-9、SOD、GSH-Px 表达升高,表明依达拉奉可通过减少细胞凋亡、调节氧化应激标志物水平来抑制缺氧脑血管内皮细胞损伤。

信号通路在人体组织中具有十分广泛的作用,不仅直接调控疾病进程,还参与药物发挥药理学作用的过程^[20]。NF- κ B 是一种真核细胞转录因子,在生命体的不同组织和器官中均广泛存在,参与细胞增殖、凋亡、炎症等生理过程^[21-22]。p65 是 NF- κ B 信号通路的亚单位,p65 表达水平升高标志着 NF- κ B 信号激活水平增加^[23]。有研究显示,依达拉奉能够通过抑制 NF- κ B 信号通路的激活发挥脑组织保护作用^[7-8]。在脑组织损伤中发现,NF- κ B 过度激活加重脑组织损伤^[24]。缺氧诱导的脑血管内皮细胞中 NF- κ B 信号激活水平增加,而抑制 NF- κ B 信号减轻细胞损伤,减少细胞凋亡^[10]。本次实验表明,依达拉奉降低了缺氧脑血管内皮细胞中 p65 表达水平,并且 NF- κ B 信号激活剂可逆转依达拉奉抗缺氧脑血管内皮细胞损伤作用,这提示依达拉奉作用机制与下调 NF- κ B 信号有关。

总而言之,依达拉奉可通过下调 NF- κ B 信号抑制缺氧脑血管内皮细胞损伤,这为研究依达拉奉抗脑组织损伤作用机制提供了资料,为依达拉奉治疗脑组织损伤提供了理论支撑。在以后的实验中

会继续研究依达拉奉通过何种靶向机制影响 NF- κ B 信号进而改善脑血管内皮细胞损伤。

参考文献

- 1 Burek M, KÖnig A, Lang M, *et al.* Hypoxia-induced microRNA-212/132 alter blood-brain barrier integrity through inhibition of tight junction-associated proteins in human and mouse brain microvascular endothelial cells [J]. *Transl Stroke Res*, 2019, 10(6): 672-683.
- 2 Tsai HH, Lin CP, Lin YH, *et al.* High-intensity interval training enhances mobilization/functionality of endothelial progenitor cells and depressed shedding of vascular endothelial cells undergoing hypoxia [J]. *Eur J Appl Physiol*, 2016, 116(11-12): 2375-2388.
- 3 Bhandari R, Kuhad A, Kuhad A. Edaravone: a new hope for deadly amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Drugs Today (Barc)*, 2018, 54(6): 349-360.
- 4 刘博会, 焦慧娟, 刘俊平, 等. 丁苯酞对急性脑梗死患者血管内皮功能和神经功能的改善 [J]. *西北药学杂志*, 2024, 39(3): 100-104.
- 5 陈烈冉, 付国惠, 刘娜, 等. 阿替普酶序贯依达拉奉治疗急性缺血性脑卒中的疗效观察 [J]. *脑与神经疾病杂志*, 2020, 28(8): 507-511.
- 6 Chen H, Chen Y, Wang X, *et al.* Edaravone attenuates myocyte apoptosis through the JAK2/STAT3 pathway in acute myocardial infarction [J]. *Free Radic Res*, 2020, 54(5): 351-359.
- 7 朱学芳, 朱建建, 沈海清. 基于 TLR4/NF- κ B 信号通路及血清 CXCL16、ACA 评价依达拉奉右莰醇对 ACI 神经功能的保护作用 [J]. *脑与神经疾病杂志*, 2023, 31(7): 401-406.
- 8 赵立斌, 贺红艳, 武文兴, 等. 依达拉奉联合川芎嗪治疗动脉瘤性蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的疗效及治疗前后血浆 sICAM-1、NF- κ B 及 ET-1 水平变化情况 [J]. *国际检验医学杂志*, 2022, 43(3): 280-284.
- 9 Mulero MC, Wang VY, Huxford T, *et al.* Genome reading by the NF- κ B transcription factors [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(19): 9967-9989.
- 10 汪云鑫, 苏乙花, 顾民华. 大黄蛰虫丸调节 IL-1 β /NF- κ B/NLRP3 信号通路对动脉粥样硬化大鼠主动脉炎性损伤的影响 [J]. *解剖学研究*, 2024, 46(4): 315-321.
- 11 张蕴, 韩新生, 张洪阳, 等. N-乙酰半胱氨酸通过 AMPK/SIRT1 途径抑制缺氧诱导的大鼠脑血管内皮细胞损伤 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(2): 107-112.
- 12 李鑫, 张蔚, 王睿韬, 等. 依达拉奉右莰醇注射用浓溶液联合灯盏细辛注射液治疗急性缺血性脑卒中的临床效果 [J]. *中国临床医生杂志*, 2024, 52(3): 299-302.

(下转 19 页)

患者机体的氧化应激损伤。川芎嗪与倍他司汀联用可协同增效,从多方面发挥治疗效果,最终有效缓解患者眩晕症状。本研究还表明,两组不良反应发生率对比无显著差异,说明两药联用安全性较好。

综上所述,川芎嗪联合倍他司汀可有效减轻老年 PCIV 患者眩晕症状,调节脑血流动力学,改善血液流变学,减轻氧化应激损伤,安全可靠,值得临床借鉴。

参考文献

- 1 Kong L, Wu J, Feng M, *et al.* Virtual simulation of otolith movement for the diagnosis and treatment of benign paroxysmal positional vertigo [J]. *Biomed Tech (Berl)*, 2021, 66 (4): 387–393.
- 2 钟华,李富瑜,翟睿,等. 甲磺酸倍他司汀联合依达拉奉右莰醇治疗后循环缺血性眩晕患者的效果分析[J]. *中国伤残医学*, 2024, 32 (15): 36–39.
- 3 Lee HJ, Jeon EJ, Nam S, *et al.* Treatment efficacy of various maneuvers for lateral canal benign paroxysmal positional vertigo with apogeotropic nystagmus: a randomized controlled trial [J]. *Clin Exp Otorhinolaryngol*, 2023, 16 (3): 251–258.
- 4 江雪娇,秦西婷. 血塞通联合倍他司汀对后循环缺血性眩晕患者椎-基底动脉血流动力学的影响[J]. *临床医学研究与实践*, 2024, 9 (28): 51–54.
- 5 代晓杰,樊同. 马来酸依那普利叶酸片联合甲磺酸倍他司汀对后循环缺血性眩晕患者眼震电图、神经功能及凝血功能的影响[J]. *陕西医学杂志*, 2023, 52 (4): 456–459, 463.
- 6 周魁,周流杨,周雨珊. 丹红注射液联合倍他司汀治疗急性眩晕患者的效果[J]. *天津药学*, 2024, 36 (2): 33–36.
- 7 中国后循环缺血专家共识组. 中国后循环缺血的专家共识[J]. *中华内科杂志*, 2006, 45 (9): 786–787.
- 8 Wang W, Hao H, Fan T, *et al.* Predictive value of acoustic cardiography for post-PCI early ventricular remodeling in acute myocardial infarction [J]. *Sci Rep*, 2023, 13 (1): 7192.
- 9 秦德凤,韩春节,华芳. 甲磺酸倍他司汀片联合丹红注射液干预对老年男性前列腺增生合并后循环缺血性眩晕的疗效观察[J]. *临床和实验医学杂志*, 2022, 21 (23): 2521–2525.
- 10 李兰英,杨珍珍,刘赞. 依达拉奉联合甲磺酸倍他司汀治疗后循环缺血性眩晕临床研究[J]. *中国药业*, 2022, 31 (13): 100–102.
- 11 林勤剑,苏方华,陈汉基,等. 眩晕膏联合倍他司汀治疗瘀血阻窍型中枢性眩晕的临床研究[J]. *中药材*, 2024, 47 (2): 489–491.
- 12 张春,蔡艳云. 倍他司汀联合前庭辅助训练对老年良性阵发性位置性眩晕的疗效[J]. *贵州医药*, 2024, 48 (7): 1061–1063.
- 13 宣方杰,王碧浪. 天麻素联合胞磷胆碱治疗后循环缺血性眩晕临床研究[J]. *新中医*, 2024, 56 (9): 41–45.
- 14 董湧,陈先让. 川芎嗪注射液联合天麻素注射液治疗脑梗死伴眩晕临床研究[J]. *新中医*, 2021, 53 (24): 77–79.
- 15 朱明辉,黎靖麟,陆婉晖,等. 探讨川芎嗪注射液联合长春西汀治疗急诊眩晕症的临床效果[J]. *中国现代药物应用*, 2021, 15 (1): 202–204.
- (上接 6 页)
- 13 张建龙,葛晓敏,赵帅,等. 依达拉奉右莰醇早期治疗急性脑梗死的疗效及对脑血管储备功能、肢体功能、神经损伤因子的影响[J]. *中国合理用药探索*, 2024, 21 (7): 75–80.
- 14 Wei W, Lan XB, Liu N, *et al.* Echinacoside alleviates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rat by enhancing antioxidant capacity and inhibiting apoptosis [J]. *Neurochem Res*, 2019, 44 (7): 1582–1592.
- 15 Li N, Li Q, Bai J, *et al.* The multiple organs insult and compensation mechanism in mice exposed to hypobaric hypoxia [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2020, 25 (5): 779–791.
- 16 Chen ZX, Xu QQ, Shan CS, *et al.* Borneol for regulating the permeability of the blood-brain barrier in experimental ischemic stroke: preclinical evidence and possible mechanism [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019: 2019: 2936737.
- 17 Rzemieniec J, Bratek E, Wnuk A, *et al.* Neuroprotective effect of 3,3'-Diindolylmethane against perinatal asphyxia involves inhibition of the AhR and NMDA signaling and hypermethylation of specific genes [J]. *Apoptosis*, 2020, 25 (9–10): 747–762.
- 18 Naik RY, Foster D, Bray P, *et al.* Monocyte chemotactic protein-1-induced protein 1 contributes to neuronal injury following hypoxic-ischemia in the neonatal mouse brain [J]. *Neuroreport*, 2020, 31 (11): 833–839.
- 19 刘朋. 依达拉奉治疗缺血性脑卒中的效果研究[J]. *中国卫生标准管理*, 2020, 11 (18): 81–83.
- 20 Williams LM, Gilmore TD. Looking down on NF- κ B [J]. *Mol Cell Biol*, 2020, 40 (15): e00104–20.
- 21 Singh SS, Rai SN, Birla H, *et al.* NF- κ B-mediated neuroinflammation in Parkinson's disease and potential therapeutic effect of polyphenols [J]. *Neurotox Res*, 2020, 37 (3): 491–507.
- 22 Bhardwaj R, Singh BP, Sandhu N, *et al.* Probiotic mediated NF- κ B regulation for prospective management of type 2 diabetes [J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47 (3): 2301–2313.
- 23 Diklić M, Mitrović-Ajtić O, Subotić T, *et al.* IL6 inhibition of inflammatory S100A8/9 proteins is NF- κ B mediated in essential thrombocythemia [J]. *Cell Biochem Funct*, 2020, 38 (4): 362–372.
- 24 Jiang LJ, Xu ZX, Wu MF, *et al.* Resatorvid protects against hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15 (7): 1316–1325.