

张慧宇,白振军,李亮,等. 雷公藤甲素通过抑制 NogoA/RhoA/ROCK 信号通路减轻氧糖剥夺/复糖复氧所致的 SH-SY5Y 细胞损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(1): 9-15.

Zhang HY, Bai ZJ, Li L, et al. Triptolide attenuates oxygen glucose deprivation/reoxygenation-induced SH-SY5Y cell injury by inhibiting the NogoA/RhoA/ROCK signaling pathway [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(1): 9-15.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.01.002

雷公藤甲素通过抑制 NogoA/RhoA/ROCK 信号通路减轻氧糖剥夺/复糖复氧所致的 SH-SY5Y 细胞损伤

张慧宇^{1*}, 白振军¹, 李 亮¹, 张金锋¹, 解佳伟¹, 邓 亮¹, 孟 燕¹, 郭敏芳²

(1.山西大同大学中医药健康服务学院,山西 大同 037009;2.山西大同大学医学院,山西 大同 037009)

【摘要】 目的 基于 Nogo-A/RhoA/ROCK 信号通路探讨雷公藤甲素减轻氧糖剥夺/复糖复氧(OGD/R)诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤的机制。**方法** CCK8 法检测不同浓度雷公藤甲素对正常 SH-SY5Y 细胞活性的影响以筛选最佳的药物作用浓度;然后将 SH-SY5Y 细胞分为 4 组:正常对照组、模型组、雷公藤甲素(1 nmol/L)干预组、Rho 激酶抑制剂法舒地尔(15 μ g/mL)干预组。CCK8 法检测 SH-SY5Y 细胞活性;JC-1 试剂盒评估线粒体膜电位;免疫荧光染色检测 NogoA、ROCK2 和 GAP43 的表达;Western blot 法检测 GAP43、PSD95、NogoA、NgR、RhoA 和 ROCK2 的表达。**结果** CCK8 结果显示,雷公藤甲素的最适作用浓度为 1 nmol/L。与正常对照组比较,模型组细胞活性降低($P<0.001$);线粒体膜电位下调($P<0.001$);GAP43 和 PSD95 表达降低($P<0.001$);同时 NogoA、NgR、RhoA 和 ROCK2 表达增加($P<0.001$);雷公藤甲素干预和法舒地尔干预均可以改善 OGD/R 诱导的细胞损伤,使细胞活性增加($P<0.001$),线粒体膜电位上升($P<0.001$);上调 GAP43 和 PSD95 表达($P<0.05$);同时下调 NogoA、NgR、RhoA 和 ROCK2 的表达($P<0.001$)。**结论** 雷公藤甲素可以通过抑制 NogoA/RhoA/ROCK 信号通路减轻 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤。

【关键词】 雷公藤甲素;氧糖剥夺/复糖复氧;神经突生长抑制因子 A;Rho 激酶;突触可塑性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 01-0009-07

Triptolide attenuates oxygen glucose deprivation/reoxygenation-induced SH-SY5Y cell injury by inhibiting the NogoA/RhoA/ROCK signaling pathway

ZHANG Huiyu^{1*}, BAI Zhenjun¹, LI Liang¹, ZHANG Jinfeng¹, XIE Jiawei¹, DENG Liang¹, MENG Yan¹, GUO Minfang²

(1. College of Traditional Chinese Medicine Health Service, Shanxi Datong University, Datong 037009, China.

2. Medical College, Shanxi Datong University, Datong 037009)

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of triptolide reducing oxygen glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R)-induced SH-SY5Y cell injury via the NogoA/RhoA/ROCK signaling pathway. **Methods** The effect of various triptolide concentrations on SH-SY5Y cell proliferation was assessed by CCK8 assays to select the optimal concentration. Cells were divided into normal control, model, triptolide (1 nmol/L) treatment and fasudil (15 μ g/mL) treatment groups. Cell proliferation was assessed by CCK8 assays. A JC-1 assay was used to measure the mitochondrial membrane potential. NogoA, ROCK2 and GAP43 expression was detected by immunofluorescence staining. GAP43, PSD95, NogoA, NgR, RhoA and ROCK2 expression was detected by Western blot. **Results** CCK8 assays showed that the optimal concentration

【基金项目】 山西省基础研究计划项目(20210302123478,20210302123476);基于炎症反应的重大疾病创新药物山西省重点实验室开放课题(2021sxscyw12);国家中医药管理局多发性硬化益气活血重点研究室开放课题(2021-KF-04T)。

【作者简介】 张慧宇(1979—),男,副教授,研究方向:中医药防治神经变性疾病。E-mail: snowstom12@163.com

of triptolide was 1 nmol/L. Cell proliferation and the mitochondrial membrane potential of the model group were significantly lower than those of the control group ($P < 0.001$). Compared with the control group, GAP43 and PSD95 expression was decreased and NogoA, NgR, RhoA and ROCK2 expression was increased in the model group ($P < 0.001$). Both triptolide and fasudil increased cell proliferation ($P < 0.001$) and mitochondrial membrane potential ($P < 0.001$), upregulated GAP43 and PSD95 expression ($P < 0.05$), and downregulated NogoA, NgR, RhoA and ROCK2 expression ($P < 0.001$). **Conclusions** Triptolide may alleviate OGD/R-induced SH-SY5Y cell injury by inhibiting the NogoA/RhoA/ROCK signaling pathway.

【Keywords】 triptolide; oxygen-glucose deprivation/reoxygenation; neurite outgrowth inhibitor A; Rho kinase; synaptic plasticity

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

缺血性脑卒中占脑卒中的 80% 以上^[1]。目前其主要的治疗方法仍然是快速溶栓,但是在某些情况下存在缺血再灌注 (ischemia-reperfusion, I/R) 损伤^[2]。损伤神经元周围存在的抑制微环境是脑 I/R 损伤后神经功能修复困难的主要原因之一。神经生长抑制因子 A (neurite outgrowth inhibitor A, NogoA) 是构成这种抑制微环境的重要成分^[3]。生理学上, NogoA 信号通过其受体在少突胶质细胞和神经元的发育成熟、髓鞘形成、调节树突棘形态和突触可塑性从而调节大脑的学习和记忆等方面具有重要作用^[4]。NogoA 可以结合 Nogo 受体 (Nogo receptor, NgR), 使其下游的 RhoA/Rho 激酶 (ROCK) 通路激活, 从而抑制轴突再生以及脊髓或脑损伤后的功能恢复^[5]。有研究显示, NogoA 与神经细胞的凋亡密切相关, 并且调节突触的可塑性^[6], 在体内, 阻断 NogoA 可导致皮质锥体神经元的树突棘密度增加, 而抗 NogoA 抗体治疗可以使由皮质控制精确运动的学习得到了改善, 表明 NogoA 是一种重要的突触可塑性调节剂, 也是运动皮层熟练动作学习的调节器^[7]。因此, 消除脑 I/R 损伤后抑制神经再生过程的障碍, NogoA/RhoA/ROCK 通路的下调非常重要。

由于溶栓治疗的时间窗窄, 并且存在 I/R 损伤和费用高等缺点。在各种卒中相关疾病的治疗方法中, 中草药疗法在古代医学体系早有描述^[8]。因此, 众多研究者致力于从中草药中寻找有效的治疗药物。雷公藤甲素是从中草药雷公藤中提取出来的活性成分, 具有神经保护作用^[9]。研究表明雷公藤甲素可以减轻脑 I/R 损伤^[10-11], 然而, 关于雷公藤甲素改善脑 I/R 损伤的机制还有待深入研究。因此, 本实验选用人神经母细胞瘤细胞株 (SH-SY5Y), 采用氧糖剥夺/复糖复氧 (oxygen glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 诱导其损伤, 观察雷公藤甲素对 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞的保护作用, 并且基于 NogoA/RhoA/ROCK 信号通路探讨其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 细胞

SH-SY5Y 人源神经母细胞瘤细胞株由军事医学研究院军事认知与脑科学研究所赠送。

1.2 主要试剂与仪器

雷公藤甲素 ($\geq 98\%$, 货号: DL0034) 购自成都乐美天医药科技有限公司; 法舒地尔 (批号: 2007171) 由天津红日药业公司提供; 胎牛血清 (货号: 16140063)、高糖 DMEM 培养基 (货号: 21013024)、无糖 DMEM 培养基 (货号: 11966025) 和青霉素-链霉素双抗混合液 (货号: 5140163) 均购自美国 Gibco 公司; NogoA 抗体 (货号: 13401)、ROCK2 抗体 (货号: 47012)、突触后密度蛋白-95 (synaptic protein postsynaptic density 95, PSD-95) 抗体 (货号: 3450)、Alex Flour[®] 594 和 Alex Flour[®] 488 标记的 IgG 二抗 (货号: 8889、4412) 均购自美国 CST 公司; NgR 抗体 (ab184556) 购自英国 Abcam 公司; RhoA 抗体 (货号: A0272)、神经元生长相关蛋白 43 (growth associated protein-43, Gap43) 抗体 (货号: A6376)、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的 IgG 二抗 (货号: AS014) 均购自 ABClonal 公司; CCK8 试剂盒 (货号: C0038)、JC-1 试剂盒 (货号: C2003S) 购自碧云天生物技术有限公司。

FV-1000 激光共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司); HERAcell 150i 三气培养箱 (美国 Thermo 公司); H1M 酶标仪 (美国伯腾); SYSTEM GelDoc XR⁺ 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); NanoDrop One 超微量分光光度计 (美国 Thermo 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 CCK8 法筛选 TP 浓度

用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的高糖 DMEM 完全培养基培养 SY5Y 细胞, 常规传代。将传代细胞 (每毫升 5×10^3 个) 接种于 96 孔板中, 于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 24 h 后加入不同浓度的雷公藤甲素 (0、0.1、1、10、50、100、500 nmol/L), 每个浓度设 5 个复孔, 药物处理 24 h 按照说明书操作进行

CCK8 检测,每孔加入 20 μ L CCK8 溶液,CO₂ 培养箱中培养 2 h,酶标仪检测 450 nm 处的光密度值(OD 值)。最后计算细胞活力,计算公式为(用药孔 OD 值-调零孔 OD 值)/(对照孔 OD 值-调零孔 OD 值) $\times$ 100%。选取可以增加细胞活性的雷公藤甲素浓度为实验使用浓度。

1.3.2 OGD/R 模型的建立及分组

将细胞分为 4 组:正常对照组、模型组、雷公藤甲素干预组(雷公藤甲素组)、Rho 激酶抑制剂法舒地尔干预组(法舒地尔组)。模型组、雷公藤甲素组和法舒地尔组细胞进行 OGD/R 诱导损伤,细胞更换无糖 DMEM 培养基,雷公藤甲素组和法舒地尔组在更换无糖 DMEM 培养基后分别加入 1 nmol/L 雷公藤甲素和 15 μ g/mL 法舒地尔,3 组细胞置于三气培养箱(94% N₂,5% CO₂,1% O₂,37℃)中培养 4 h,然后模型组更换为完全培养基,雷公藤甲素组和法舒地尔组分别更换含有 1 nmol/L 雷公藤甲素和 15 μ g/mL 法舒地尔的完全培养基。37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后进行后续实验。对照组细胞加完全培养基于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。

1.3.3 细胞活性的检测

细胞复糖复氧 24 h 后按照上述 CCK8 检测方法检测 4 组细胞的活性。细胞活性计算公式为(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值) $\times$ 100%。评估雷公藤甲素对 OGD/R 诱导的细胞损伤的保护效果。

1.3.4 线粒体膜电位的检测

将细胞(1×10^4 个/孔)接种于激光共聚焦培养皿内,复糖复氧 24 h 后每孔加入 1 mL JC-1 工作液,37℃ 恒温孵育 20 min 后用 JC-1 染色缓冲液洗涤,于激光共聚焦显微镜下观察。

1.3.5 免疫荧光染色

复糖复氧 24 h 后,将接种于 24 孔板内细胞爬片上的细胞用 4% 多聚甲醛固定 1 h,PBS 洗涤后用含有 0.3% Triton X-100 和 1% 牛血清白蛋白的封闭液室温封闭 1 h,加入一抗 NogoA、ROCK2、GAP43 (1:1000),4℃ 过夜后加入 594 或 488 标记的山羊抗兔 IgG 二抗,室温孵育 2 h 后用封片液封片,激光共聚焦显微镜下观察。

1.3.6 Western blot 法检测

复糖复氧 24 h 后,加入 RIPA 裂解液提取细胞蛋白质,使用微量分光光度计进行蛋白定量并将各组蛋白浓度调齐。10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,然后将蛋白转至 PVDF 膜,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h,加入一抗 GAPDH (1:1000) 或 NogoA、NgR、RhoA、ROCK2、PSD-95、GAP43 (1:500),4℃ 过夜后加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:5000),室温孵育 2 h 后 TBST 洗膜,最后用凝胶成像系统显影。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析,计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示,所有实验均重复 3 次。组间差异采用单因素方差分析,两两比较采用 Dunnett-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 雷公藤甲素浓度筛选

CCK8 结果显示,当雷公藤甲素浓度 ≤ 10 nmol/L 时,细胞受药物影响小,细胞活力与对照孔相比差异无显著性意义;当雷公藤甲素浓度 ≥ 50 nmol/L 时,细胞活力下降,与对照孔相比差异有显著性意义($P < 0.001$),见表 1。可见雷公藤甲素浓度在 ≤ 10 nmol/L 时对细胞无毒性,而且雷公藤甲素浓度为 0.1 nmol/L 和 1 nmol/L 时可增加细胞活性,因此后续我们选择雷公藤甲素浓度为 1 nmol/L 进行实验。

2.2 雷公藤甲素对细胞活性的影响

CCK8 结果显示,模型组的细胞活性较正常对照组明显降低($P < 0.001$);与模型组相比,雷公藤甲素组和法舒地尔组细胞活性有显著性提高($P < 0.001$)。并且雷公藤甲素组和法舒地尔组相比,细胞活性无显著差异,见表 2。

表 1 不同雷公藤甲素浓度对正常 SH-SY5Y 细胞活力的影响($n=5$)

Table 1 Effects of triptolide of different concentrations on the viability of normal SH-SY5Y cells

给药浓度(nmol/L) Drug concentration	细胞活性(%) Cell viability
0	100.00 $\pm$ 0.00
0.1	104.09 $\pm$ 5.37
1	104.63 $\pm$ 7.43
10	97.32 $\pm$ 6.68
50	71.86 $\pm$ 5.65 ^a
100	45.29 $\pm$ 3.11 ^a
500	40.79 $\pm$ 2.63 ^a

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.001$ 。

Note. Compared with the control group, ^a $P < 0.001$.

表 2 雷公藤甲素对 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞的保护作用($n=5$)

Table 2 Protective effect of triptolide on SH-SY5Y cells injured by OGD/R

组别 Groups	细胞活性(%) Cell viability
正常对照组 Normal control group	100.00 $\pm$ 0.00
模型组 Model group	72.92 $\pm$ 3.96 ^a
雷公藤甲素组 Triptolide group	86.67 $\pm$ 2.59 ^{bc}
法舒地尔组 Fasudil group	88.01 $\pm$ 2.34 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.001$;与模型组比较,^b $P < 0.001$;与法舒地尔组比较,^c $P > 0.05$ 。

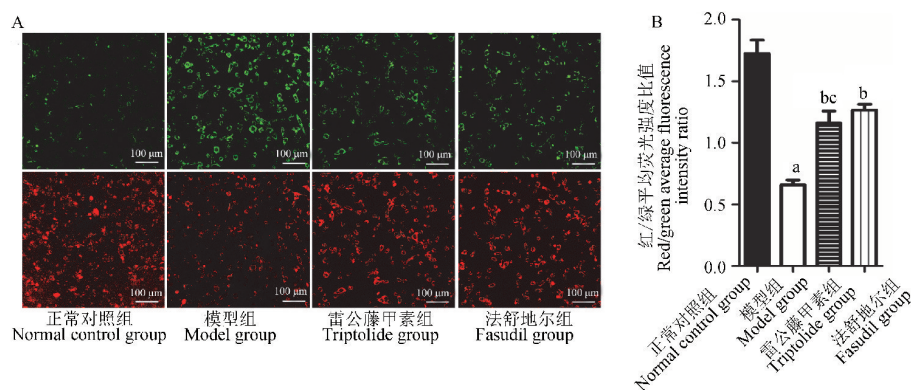
Note. Compared with the normal control group, ^a $P < 0.001$. Compared with the model group, ^b $P < 0.001$. Compared with the fasudil group, ^c $P > 0.05$.

2.3 雷公藤甲素对细胞线粒体膜电位的影响

线粒体膜电位下降时 JC-1 产生绿色荧光;线粒体膜电位升高时 JC-1 产生红色荧光。结果显示,与正常对照组相比,模型组细胞的红/绿荧光强度比值明显下降($P<0.001$);与模型组比较,雷公藤甲素组和法舒地尔组细胞的红/绿荧光强度比值均显著增加($P<0.001$);雷公藤甲素组和法舒地尔组相比,红/绿荧光强度比值无显著差异见图 1。

2.4 雷公藤甲素对突触蛋白的影响

免疫荧光染色和 Western blot 结果显示,与正常对照组相比,模型组细胞突触相关蛋白 GAP43 和 PSD-95 的表达明显下降($P<0.001$);与模型组比较,雷公藤甲素组和法舒地尔组细胞 GAP43 和 PSD-95 的表达均显著升高($P<0.05$);雷公藤甲素组和法舒地尔组相比无显著差异,具体内容详见图 2。

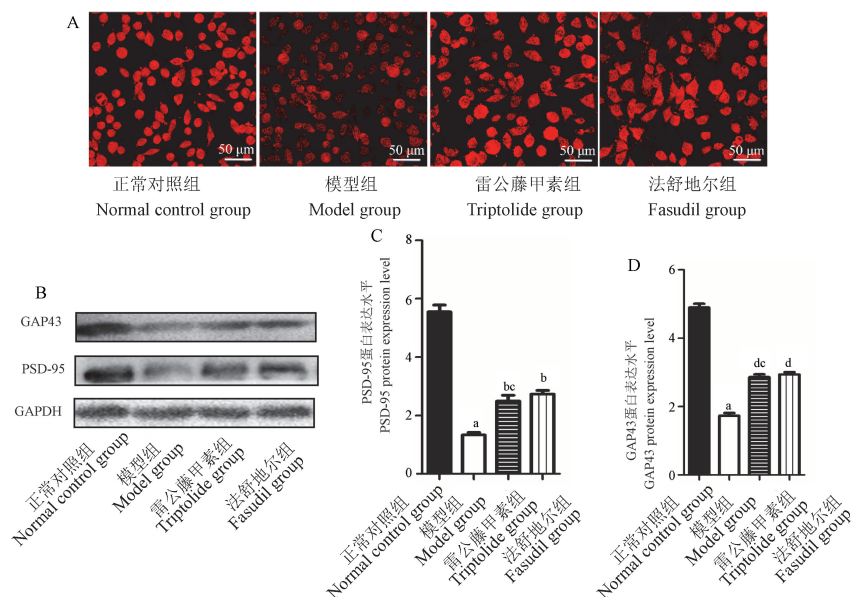


注:A:JC-1 染色荧光图;B:各组细胞红/绿平均荧光强度比值的统计图。与正常对照组比较,^a $P<0.001$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与法舒地尔组比较,^c $P>0.05$ 。

图 1 雷公藤甲素对 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位的影响

Note. A, JC-1 staining fluorescence diagram. B, Statistical chart of red/green average fluorescence intensity ratio of each group cells. Compared with the normal normal control group, ^a $P<0.001$. Compared with the model group, ^b $P<0.05$. Compared with the fasudil group, ^c $P>0.05$.

Figure 1 Effect of triptolide on the mitochondrial membrane potential in SH-SY5Y cells injured by OGD/R



注:A:免疫荧光染色检测 GAP43 的表达;B:GAP43 和 PSD-95 蛋白免疫印迹条带图;C: PSD-95 蛋白表达水平统计图;D:GAP43 蛋白表达水平统计图。与正常对照组比较,^a $P<0.001$;与模型组比较,^b $P<0.01$,^d $P<0.001$;与法舒地尔组比较,^c $P>0.05$ 。

图 2 雷公藤甲素对 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞突触蛋白的影响

Note. A, Immunofluorescence staining detect the expression of GAP43. B, Western blot assay of GAP43 and PSD-95. C, Statistical chart of PSD-95 protein expression level. D, Statistical chart of GAP43 protein expression level. Compared with the normal control group, ^a $P<0.001$. Compared with the normal model group, ^b $P<0.01$, ^d $P<0.001$. Compared with the fasudil group, ^c $P>0.05$.

Figure 2 Effect of triptolide on the expression of synaptic protein in SH-SY5Y cells injured by OGD/R

2.5 雷公藤甲素对 NogoA/RhoA/ROCK 信号通路蛋白的影响

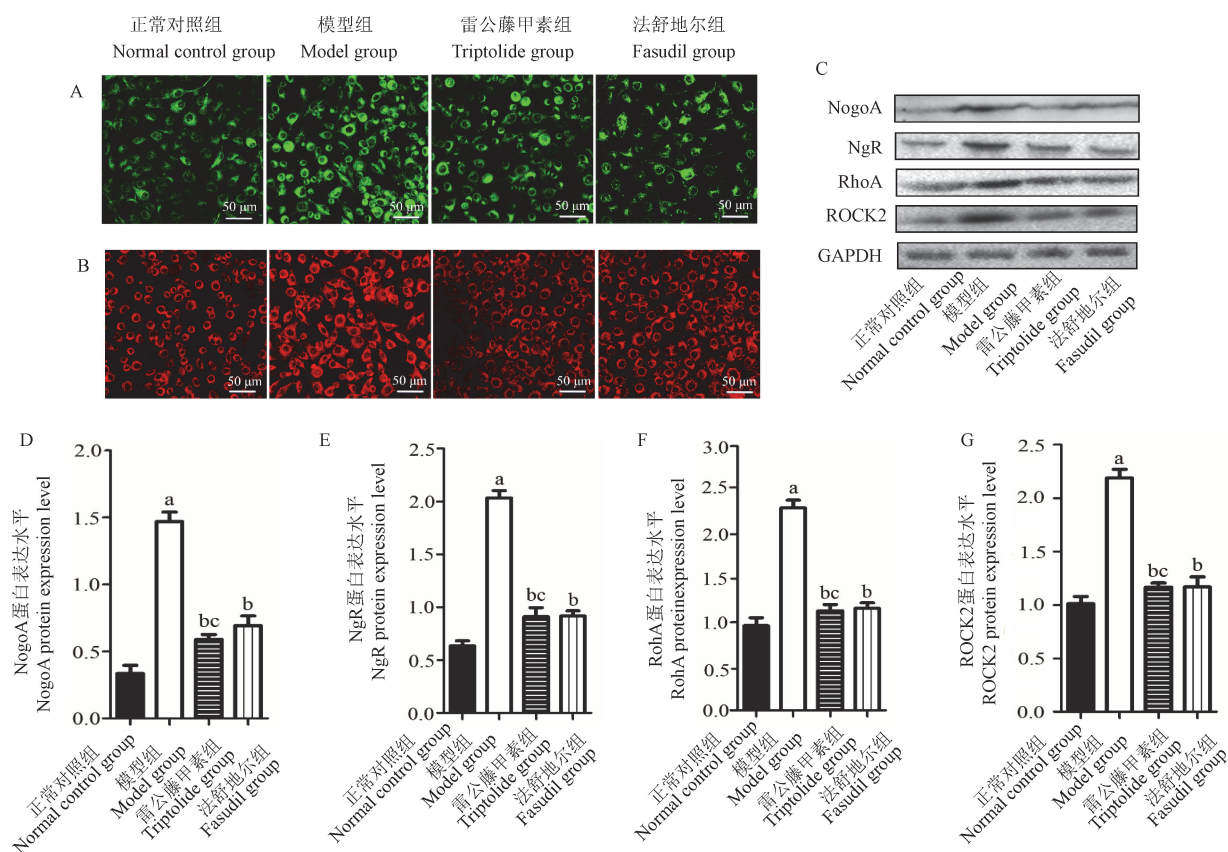
免疫荧光染色和 Western blot 结果显示,与正常对照组相比,模型组细胞 NogoA、NgR、RhoA、ROCK2 的表达均明显增加 ($P<0.001$);与模型组比较,雷公藤甲素组和法舒地尔组细胞 NogoA、NgR、RhoA、ROCK2 的表达均下调 ($P<0.001$);雷公藤甲素组和法舒地尔组相比无显著差异,见图 3。

3 讨论

多项研究表明,雷公藤甲素可以改善脑 I/R 损伤,其机制可能与抑制氧化应激和神经炎症、调节自噬、抗凋亡等有关^[12-13]。因此雷公藤甲素可能成为脑卒中的潜在治疗药物。本实验在体外建立

SH-SY5Y 细胞的 OGD/R 损伤模型,作为脑 I/R 损伤的细胞模型,观察了雷公藤甲素对 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞的保护效果。CCK8 结果显示 OGD/R 可以导致细胞活性降低,而雷公藤甲素干预增加了细胞活性,减轻了细胞损伤。JC-1 染色显示了同样的结果,模型组细胞的线粒体膜电位下降,雷公藤甲素干预可以使线粒体膜电位升高。表明雷公藤甲素对 OGD/R 诱导的细胞损伤具有保护效应。

GAP43 是轴突生长锥的主要蛋白,被认为是轴突可塑性的内在决定因素,是轴突再生的主要标志物,参与神经元的分化、可塑性和再生^[14]。GAP43 表达增加可能是脑缺血后功能恢复的机制之一^[15]。PSD-95 是维持兴奋性神经元突触后密度区建立的



注:A:免疫荧光染色检测 NogoA 的表达;B:免疫荧光染色检测 ROCK2 的表达;C:NogoA、NgR、RhoA、ROCK2 蛋白免疫印迹条带图;D:NogoA 蛋白表达水平统计图;E:NgR 蛋白表达水平统计图;F:RhoA 蛋白表达水平统计图;G:ROCK2 蛋白表达水平统计图。与正常对照组比较, ^a $P<0.001$;与模型组比较, ^b $P<0.001$;与法舒地尔组比较, ^c $P>0.05$ 。

图 3 雷公藤甲素对 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞 NogoA/RhoA/ROCK 信号通路蛋白的影响

Note. A, Immunofluorescence staining detect the expression of NogoA. B, Immunofluorescence staining detect the expression of ROCK2. C, Western blot assay of NogoA, NgR, RhoA and ROCK2. D, Statistical chart of NogoA protein expression level. E, Statistical chart of NgR protein expression level. F, Statistical chart of RhoA protein expression level. G, Statistical chart of ROCK2 protein expression level. Compared with the normal control group, ^a $P<0.001$. Compared with the model group, ^b $P<0.001$. Compared with the fasudil group, ^c $P>0.05$.

Figure 3 Effect of triptolide on the expression of NogoA/RhoA/ROCK signaling pathway protein in SH-SY5Y cells injured by OGD/R

关键,与神经元功能和存活密切相关,PSD-95 蛋白可以通过对抗兴奋性毒性为脑卒中提供神经保护作用,PSD-95 水平增加可以促进突触可塑性^[16]。免疫荧光和 Western blot 结果均显示,OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞中 GAP43 和 PSD-95 的表达均减少,表明 OGD/R 在诱导细胞损伤的同时减弱了神经元突触功能。而雷公藤甲素干预不仅可以减轻 OGD/R 诱导的细胞损伤,还可以使 GAP43 和 PSD-95 表达增加,促进突触可塑性。

脑 I/R 损伤的病理生理过程极为复杂。而成人脑组织缺血缺氧后通过轴突再生或者代偿性纤维生长来自修复是极为有限且不完全的,原因有多方面,包括神经营养因子的减少、抑制性蛋白的产生、胶质瘢痕的形成等等,会形成抑制性微环境,从而限制受损神经元的结构可塑性^[17]。其中 NogoA 作为轴突再生的主要障碍受到了广泛关注。NogoA 通过激活细胞内 RhoA/ROCK 通路,抑制轴突生长,阻碍神经再生和修复^[18]。有研究显示,在全脑缺血大鼠中,NogoA 的表达在 6 h 显著增加,持续 7 d^[19]。Eslamboli 等^[20]报告绒猴脑缺血后 2 个月内 NogoA 水平持续升高。并且在脑 I/R 损伤的动物模型脑组织中 NogoA 也表现为升高状态^[21-22]。因此,NogoA 参与缺血性脑卒中的病理过程。而抗 NogoA 免疫疗法可改善中枢神经损伤后的神经再生和神经可塑性,并改善脑卒中动物模型的预后^[23]。还有研究显示,脑 I/R 损伤大鼠脑组织中 RhoA 和 ROCK 基因和蛋白表达水平均显著升高^[24],而 ROCK 抑制剂法舒地尔可以刺激脑 I/R 损伤大鼠轴突再生并增加脑血流量^[25]。这些结果均表明,抑制 NogoA/RhoA/ROCK 通路可能有助于 I/R 脑损伤的恢复。虽然有研究表明雷公藤甲素可以改善脑 I/R 损伤,但是其机制尚不明确。本研究结果显示,与正常对照组相比,模型组细胞 NogoA、NgR、RhoA 和 ROCK 的表达均增加,与模型组相比,雷公藤甲素干预组细胞 NogoA、NgR、RhoA 和 ROCK 的表达均减少。我们同时采用了 ROCK 抑制剂法舒地尔对 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞进行干预。观察到雷公藤甲素对 OGD/R 损伤的 SH-SY5Y 细胞的保护作用与法舒地尔相当,法舒地尔干预同样能使细胞活性和线粒体膜电位增加,并且使 GAP43 和 PSD-95 的表达增加,NogoA、NgR、RhoA 和 ROCK2 的表达下调,并且和雷公藤甲素干预组相比没有统计意义。这些结果均表明雷公藤甲素可能通过抑制 NogoA/RhoA/ROCK

通路发挥神经保护作用。

综上所述,雷公藤甲素可能通过抑制神经元内 NogoA/RhoA/ROCK 通路的激活改善 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤,并且促进突触可塑性。此研究为深入探讨雷公藤甲素对脑 I/R 损伤的保护作用以及作用机制奠定基础。

参考文献:

- [1] Kuriakose D, Xiao Z. Pathophysiology and treatment of stroke: present status and future perspectives [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7609.
- [2] Wu MY, Yiang GT, Liao WT, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(4): 1650-1667.
- [3] Wälchli T, Pernet V, Weinmann O, et al. Nogo-A is a negative regulator of CNS angiogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(21): 1943-1952.
- [4] Tang BL. Nogo-A and the regulation of neurotransmitter receptors [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(11): 2037-2038.
- [5] Schwab ME. Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11(12): 799-811.
- [6] Guo MF, Zhang HY, Zhang PJ, et al. Fasudil reduces β -amyloid levels and neuronal apoptosis in APP/PS1 transgenic mice via inhibition of the Nogo-A/NgR/RhoA signaling axis [J]. *J Integr Neurosci*, 2020, 19(4): 651-662.
- [7] Zemmar A, Weinmann O, Kellner Y, et al. Neutralization of Nogo-A enhances synaptic plasticity in the rodent motor cortex and improves motor learning *in vivo* [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(26): 8685-8698.
- [8] Luo Y, Wang CZ, Hesse-Fong J, et al. Application of Chinese medicine in acute and critical medical conditions [J]. *Am J Chin Med*, 2019, 47(6): 1223-1235.
- [9] Zhang L, Chang J, Zhao Y, et al. Fabrication of a triptolide-loaded and poly-gamma-glutamic acid-based amphiphilic nanoparticle for the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 2051-2064.
- [10] Jin XQ, Ye F, Zhang JJ, et al. Triptolide attenuates cerebral ischemia and reperfusion injury in rats through the inhibition the nuclear factor- κ B signaling pathway [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2015, 11: 1395-1403.
- [11] Pan W, Xu Z. Triptolide mediates Wnt/ β -catenin signalling pathway to reduce cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Folia Neuropathol*, 2020, 58(4): 324-333.
- [12] Yang Y, Gao K, He Z, et al. Autophagy upregulation and apoptosis downregulation in DAHP and triptolide treated cerebral ischemia [J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 120198.
- [13] Zhang B, Song C, Feng B, et al. Neuroprotection by triptolide against cerebral ischemia/reperfusion injury through the inhibition of NF- κ B/PUMA signal in rats [J]. *Ther Clin Risk Manag*,

- 2016, 12: 817–824.
- [14] Frey D, Laux T, Xu L, et al. Shared and unique roles of CAP23 and GAP43 in actin regulation, neurite outgrowth, and anatomical plasticity [J]. J Cell Biol, 2000, 149(7): 1443–1454.
- [15] Zhao H, Liu ZD, Zhang YB, et al. NEP140 promotes myelin regeneration via upregulation of GAP43 and MAP2 expression after focal cerebral ischemia in rats [J]. Mol Med Rep, 2021, 24(6): 844.
- [16] Ugalde-Triviño L, Díaz-Guerra M. PSD-95: an effective target for stroke therapy using neuroprotective peptides [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(22): 12585.
- [17] Filbin MT. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS [J]. Nat Rev Neurosci, 2003, 4(9): 703–713.
- [18] Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration [J]. Nature, 2001, 409(6818): 341–346.
- [19] Zhou C, Li Y, Nanda A, et al. HBO suppresses NogoA, NgR or RhoA expression in the cerebral cortex after global ischemia [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 309(2): 368–376.
- [20] Eslamboli A, Grundy RI, Irving EA. Timedependent increase in NogoA expression after focal cerebral ischemia in marmoset monkeys [J]. Neurosci Lett, 2006, 408(2): 8993.
- [21] Zhai ZY, Feng J. Constraint-induced movement therapy enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia/reperfusion [J]. Neural Regen Res, 2019, 14(10): 1743–1754.
- [22] Hong L, Chen W, He L, et al. Effect of naoluoxtong on the NogoA/RhoA/ROCK pathway by down-regulating DNA methylation in MCAO rats [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 281: 114559.
- [23] Kumar P, Moon LD. Therapeutics targeting Nogo-A hold promise for stroke restoration [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2013, 12(2): 200–208.
- [24] 邓莉, 赵延礼, 何宗钊, 等. 基于 Rho/Rho-kinase 信号通路探讨丙泊酚减轻大鼠脑缺血再灌注损伤的效果 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 73–78.
- [25] Fukuta T, Asai T, Sato A, et al. Neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury by intravenous administration of liposomal fasudil [J]. Int J Pharm, 2016, 506(1–2): 129–137.

[收稿日期] 2022-05-19

《中国实验动物学报》稿约

国内刊号 CN 11-2986/Q 国际刊号 ISSN 1005-4847 邮局代号 2-748

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与动物实验相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究快报和进展与综述。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》等数据库收录。

二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章字数在 6000 字之内。

投稿网址: <http://zgxydw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!