氟比洛芬酯调节 Akt/GSK-3β/Nrf2/HO-1 信号通路改善 H/R 诱导的神经元损伤相关研究

张春瑞[1]，尉建辉[2*]
（1. 汉中市人民医院神经内科，陕西汉中 723000；2. 宝鸡市中心医院神经内科，陕西宝鸡 721000）

摘要：目的 探究氟比洛芬酯对缺氧 / 复氧（hypoxia/reoxygenation，H/R）诱导的神经元损伤的影响及对有关调控机制。**方法** H/R 诱导构建神经元损伤模型。细胞计数法检测细胞存活率；流式细胞术检测细胞凋亡率；透射电镜观察神经元损伤情况；酶联免疫吸附剂测定法检测氧化应激及炎症因子表达；蛋白质免疫印迹法检测通路蛋白水平。**结果** 较对照组，H/R 组神经元损伤严重，神经元生存率降低［(40.51±4.03)% *vs* 100%］，凋亡率［(66.48±6.83)% *vs* (1.03±0.18)%］、氧化应激及炎症反应升高，并激活 Akt/GSK-3β/Nrf2/HO-1 信号通路（$P < 0.01$）。氟比洛芬酯可缓解 H/R 诱导的神经元损伤，升高神经元存活率［(73.36±7.08)% *vs* (40.51±4.03)%］，降低凋亡率［(32.27±3.45)% *vs* (66.48±6.83)%］，抑制氧化应激、炎症反应以及 Akt/GSK-3β/Nrf2/HO-1 信号通路（$P < 0.01$）。**结论** 氟比洛芬酯可能通过促进氧化应激通路活化，保护神经元免受 H/R 诱导损伤。

关键词： 氟比洛芬酯；神经元损伤；缺氧 / 复氧；信号通路
中图分类号： R96 **文献标志码：** A **文章编号：** 1672-9188(2023)06-0567-07
DOI：10.13683/j.wph.2023.06.009

Studies on flurbiprofen exate modulating Akt/GSK-3β/Nrf2/HO-1 signaling pathways to ameliorate H/R-induced neuronal damage

ZHANG Chunrui[1], WEI Jianhui[2*]
(*1. Department of Neurology, Hanzhong People's Hospital, Hanzhong 723000, Shanxi Province, China;*
2. Department of Neurology, Baoji Central Hospital, Baoji 721000, Shanxi Province, China)

Abstract: ***Objective*** To investigate the effect of flurbiprofen axetil on hypoxia/reoxygenation(H/R)-induced neuronal injury and its regulatory mechanism. ***Methods*** Neuronal injury model was induced by H/R. Cell survival rate was detected by cell counting kit-8. The apoptosis rate was detected by flow cytometry. The neuronal injury was observed by transmission electron microscopy. The expression of oxidative stress and inflammatory factors were detected by enzyme linked immunosorbent assay. The protein level of the pathway was detected by western blotting (WB). ***Results*** Compared with the control group, the neurons in the H/R group were severely damaged, the neuronal survival rate［(40.51±4.03)% *vs* 100%］was reduced, the apoptosis rate［(66.48±6.83)% *vs* (1.03±0.18)%］and the oxidative stress and inflammatory response were increased, and the Akt/GSK-3β/Nrf2/HO-1 signaling pathway was activated($P<0.01$). Flurbiprofen axetil can alleviate H/R-induced neuronal injury, elevated neuronal survival rate［(73.36±7.08)% *vs* (40.51±4.03)%］, reduce cell apoptosis rate［(32.27±3.45)% *vs* (66.48±6.83)%］, and inhibit oxidative stress, inflammatory response and the Akt/GSK-3β/Nrf2/HO-1 signaling pathway($P<0.01$). ***Conclusion*** Flurbiprofen axetil may protect neurons from H/R-induced injury by promoting the activation of oxidative stress pathway.

Key words: flurbiprofen axetil; neuronal injury; hypoxia/reoxygenation; signal pathway

收稿日期： 2023-01-30
作者简介： 张春瑞，副主任医师，研究方向：神经内科疾病的研究。
通信作者： 尉建辉，副主任医师，研究方向：中西医结合脑血管病的诊治与研究。
基金项目： 陕西省自然科学基础研究计划(2020JM-706)

缺氧是多种缺血缺氧性疾病发展的关键环节[1]。缺氧条件下，氧化应激及炎症反应是引起细胞损伤及凋亡的关键机制[2]。核因子红系2相关因子（nuclear factor-erythroid 2-related factor，Nrf2）是抗炎、抗氧化应激及抗凋亡的核心因子，应激条件下Nrf2活化可通过调控下游抗炎、抗氧化酶如血红素加氧酶（heme oxygenase，HO）-1等蛋白表达，发挥抗应激保护作用[3]。但近来研究显示，Nrf2/HO-1抗应激保护作用可被Akt/糖原合成激酶（glycogen synthase kinase，GSK）-3β途径阻断[4]。这预示缺血缺氧性神经元损伤过程，Nrf2/HO-1及Akt/GSK-3β通路可能同时参与其应激反应调节。

氟比洛芬酯为手术及各种癌性疼痛的镇痛药，可通过抑制脊髓或神经外周环氧合酶的生成，降低痛觉敏感[5]。近来大量体内研究显示，氟比洛芬酯可通过抗炎、抗氧化应激作用缓解脑缺血患者应激性反应，这为抗脑缺血缺氧损伤的治疗提供一定思路[6]。但氟比洛芬酯抗脑缺血缺氧神经损伤的分子调控机制还不甚明确。本研究用缺氧/复氧（hypoxia/reoxygenation，H/R）条件模拟脑缺血缺氧后神经元损伤，从Nrf2/HO-1及Akt/GSK-3β抗应激保护途径，对此进行研究验证，以期为氟比洛芬酯在脑神经系统领域的疗效提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠原代脑皮层神经元细胞（RAT-N005）购自上海传秋生物科技有限公司；氟比洛芬酯（10 mg，9150-79-6，深圳海思安生物技术有限公司）；Akt/GSK-3β通路抑制剂（wortmannin）（0.5 mg，YT356-DYX，北京百奥莱博科技有限公司）；Nrf2干扰载体（shNrf2）由上海生工生物工程公司合成；超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）-α酶联免疫吸附测定（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒均购自上海实业公司；Akt（ab8850）、磷酸化Akt（p-Akt）（ab81283）、GSK-3β（ab32391）、磷酸化GSK-3β（p-GSK-3β）（ab68476）、Nrf2（ab92946）、HO-1（ab68477）、β-actin（ab8226）等抗体均购自美国Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与处理

新购的原代鼠源脑皮层神经元细胞株，于37 ℃水温复苏后，取适量，用DMEM/F12培养基进行1∶4传代计数。取对数生长期细胞，参照文献[7]方法在缺氧条件（37 ℃、5%二氧化碳、95%氮气）中培养2 h后，移至常氧培养箱（37 ℃、5%二氧化碳）中培养48 h，复制H/R损伤模型。

氟比洛芬酯参照文献[8]设置浓度分别为0、0.01、0.1、1、10 μmol/L，处理培养H/R诱导的神经元细胞，用细胞计数试剂盒（cell counting kit，CCK）-8法检测细胞生存率，选取适宜浓度的氟比洛芬酯进行后续实验。

将神经元细胞按5×10^6个/ml、每孔100 μl密度接种至96孔板中，设置为7组，分别为：①对照组（细胞常氧培养）。②H/R组（细胞的氟比洛芬酯浓度为0）。③氟比洛芬酯组（即细胞在H/R组基础上加入0.1 μmol/L的氟比洛芬酯进行培养）。④wortmannin组（即细胞在H/R处理前，参照文献[9]加入终浓度为0.1 μmol/L的Akt/GSK-3β通路抑制剂wortmannin进行干预培养）。⑤shNrf2组（即细胞参照文献[10]方法转染Nrf2干扰载体后24 h，调整浓度进行H/R处理）。⑥氟比洛芬酯＋wortmannin组（即细胞在wortmannin组基础上加入氟比洛芬酯0.1 μmol/L后，进行H/R处理）。⑦氟比洛芬酯＋shNrf2组（即细胞在shNrf2组基础上加入氟比洛芬酯0.1 μmol/L后，进行H/R处理），每组设置3个复孔。

1.2.2 CCK-8法检测细胞生存率

收集各组细胞，加入浓度为10%的CCK-8溶液，继续培养2 h后，于酶标仪上测定各孔在450 nm波长下的光密度（optical density，OD）值，根据OD值计

算生存率，生存率＝实验组 OD/ 对照组 OD×100%。实验重复 3 次。

1.2.3 流式细胞仪检测凋亡率

收集培养后的各组细胞，使用磷酸盐缓冲液（phosphate buffered solution，PBS）洗涤后，用 70% 乙醇固定。将固定后的细胞在 PBS 中再洗涤两次，在 50 μg/ml RNase A 存在下用 PI/FITC Annexin V 染色，然后在室温下黑暗孵育 1 h。使用流式细胞仪上机检测各组细胞凋亡率。实验重复 3 次。

1.2.4 透射电镜观察细胞结构损伤

培养后的各组细胞，经 2.5% 戊二醛、l% 四氧化锇固定后，用 2% 醋酸铀水溶液染色、纯丙酮透化，2% 醋酸铀复染处理后，于电镜下观察细胞结构变化。

1.2.5 ELISA 法检测细胞 SOD、MDA、TNF-α 水平变化

培养后的各组细胞，粉碎匀浆后，取匀浆液，按 ELISA 说明书方法检测 SOD、MDA、TNF-α 水平。实验重复 3 次。

1.2.6 蛋白质免疫印迹（western blot，WB）法检测细胞 Akt/GSK-3β/Nrf2/HO-1 通路蛋白表达

收集培养后的各组细胞，粉碎匀浆后，提取胞浆及胞核中总蛋白，BCA 法测定总蛋白浓度，进行十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳、聚偏二氟乙烯膜（polyvinylidene fluoride，PVDF）转膜操作，加入 1 ∶ 2 000 浓度的 Akt、p-Akt、GSK-3β、p-GSK-3β、Nrf2、HO-1 抗体及内参 β-actin 抗体 4 ℃过夜孵育，含辣根过氧化物酶耦合的二抗（1 ∶ 3 000）室温孵育 2 h，ECL 显色试剂盒显色，全能型凝胶成像分析系统分析蛋白条带相对灰度值。实验重复 3 次。

1.3 统计学分析

以 SPSS22.0 软件统计分析数据，计量资料以（$\bar{x}\pm s$）表示，两组间比较采用配对样本 t 检验，多组间比较用单因素方差分析，进一步两两比较用 *SNK-q* 检验，校正检验水准 α，以 $P<0.01$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度氟比洛芬酯对 H/R 处理的神经元细胞生存率的影响

较对照组，H/R 组神经元细胞生存率降低（$P<0.01$）；0.1 至 10 μmol/L 的氟比洛芬酯浓度可明显升高 H/R 诱导处理的神经元细胞生存率（$P<0.01$），并在浓度上升时生存率趋于平衡，因此，选择 0.1 μmol/L 浓度的氟比洛芬酯进行后续实验，见表 1。

表 1 神经元细胞生存率比较（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

Table 1 Comparison of neuronal cell survival rat（$\bar{x}\pm s$, $n=9$）

组别	生存率/%
对照组	100
H/R组	40.51±4.03*
氟比洛芬酯（0.01 μmol/L）组	43.24±4.04
氟比洛芬酯（0.1 μmol/L）组	70.38±7.03#△
氟比洛芬酯（1.0 μmol/L）组	72.45±7.25#△
氟比洛芬酯（10.0 μmol/L）组	75.26±7.13#△
*F*值	143.583
*P*值	＜0.001

注：较对照组，*$P<0.01$；较 H/R 组，#$P<0.01$；较氟比洛芬酯（0.01 μmol/L）组，△$P<0.01$。

Note: *vs* the control group, *$P<0.01$; *vs* the H/R group, #$P<0.01$; *vs* the flurbiprofen axetil（0.01 μmol/L）group, △$P<0.01$.

2.2 氟比洛芬酯处理对神经元细胞结构损伤的影响

电镜观察可见，对照组神经元细胞线粒体及内质网结构正常，无明显损伤。H/R 组神经元细胞可见线粒体空泡化严重，内质网核糖体减少。氟比洛芬酯组神经元细胞可见线粒体空泡化减少，内质网核糖体逐渐增多。wortmannin 组及 shNrf2 组神经元细胞线粒体及内质网空泡化进一步加重。氟比洛芬酯＋ wortmannin 组及氟比洛芬酯＋ shNrf2 组神经元细胞线粒体及内质网结构损伤较氟比洛芬酯组严重，见图 1。

2.3 氟比洛芬酯处理对神经元细胞生存率及凋亡率的影响

较对照组，H/R 组细胞生存率降低（$P<0.01$），凋亡率升高（$P<0.01$）。较 H/R 组，氟比洛芬酯组

细胞生存率升高（$P<0.01$），凋亡率降低（$P<0.01$）。wortmannin 组及 shNrf2 组细胞生存率较 H/R 组进一步降低（$P<0.01$），凋亡率较 H/R 组进一步升高（$P<0.01$）。较氟比洛芬酯组，氟比洛芬酯＋wortmannin 组及氟比洛芬酯＋ shNrf2 组细胞生存率降低（$P<0.01$），凋亡率升高（$P<0.01$），见图 2 和表 2。

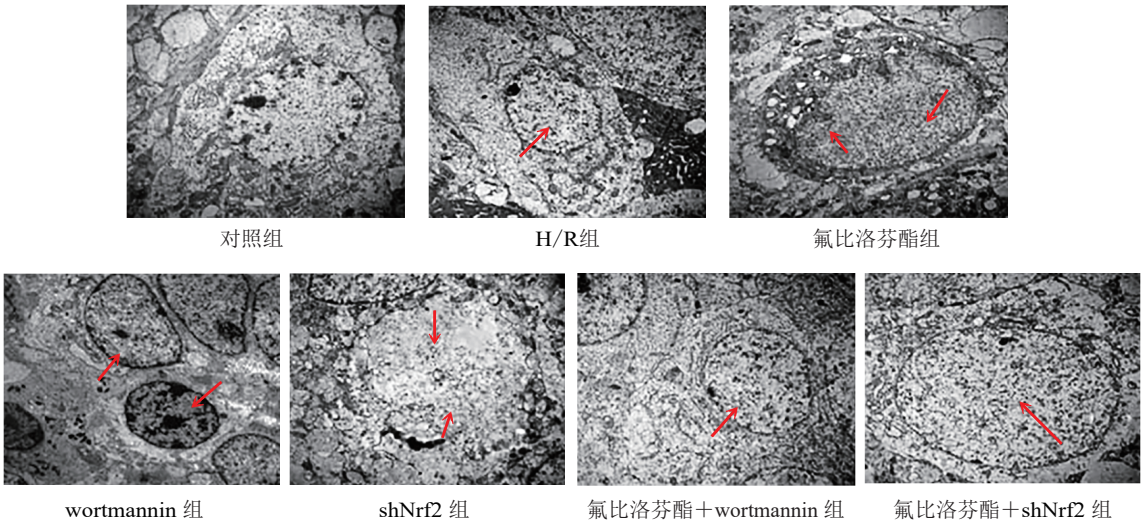


图 1　各组细胞超微结构观察图（电镜，×15 000）

Figure 1　Ultrastructural observation of cells in each group（electron microscope, ×15 000）

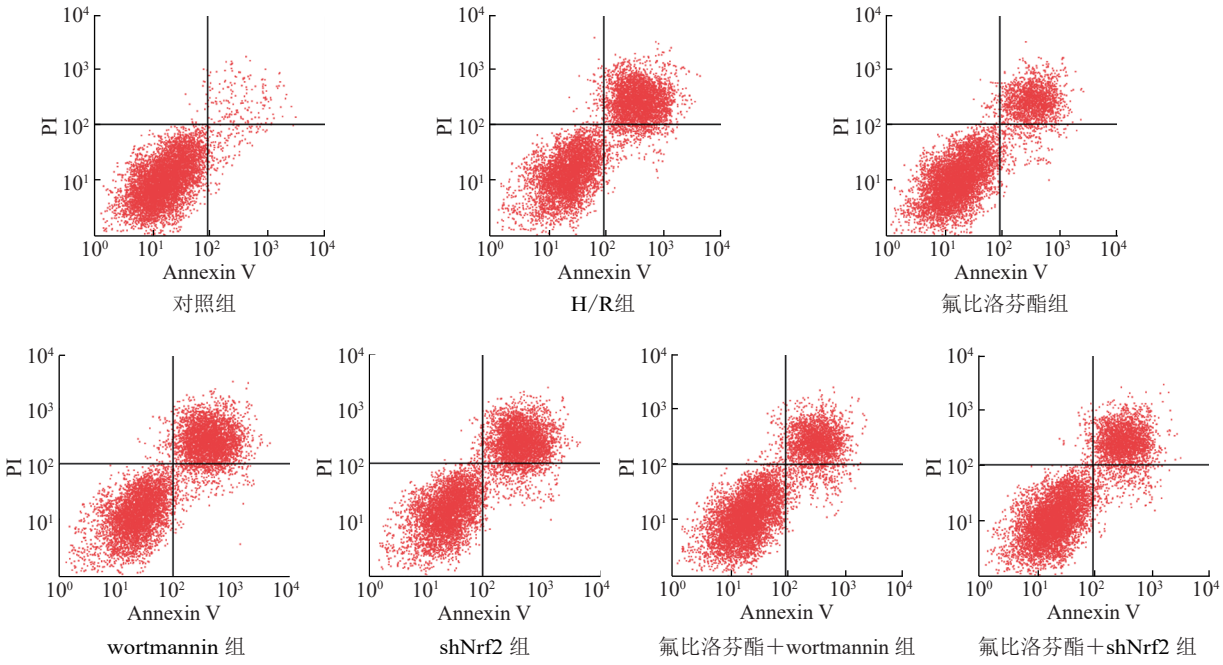


图 2　各组细胞流式检测图

Figure 2　Flow cytometry of each group

表 2 各组细胞生存率、凋亡率比较（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

Table 2 Comparison of survival rate and apoptosis rate in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	生存率/%	细胞凋亡率/%
对照组	100	1.03±0.18
H/R组	40.51±4.03*	66.48±6.83*
氟比洛芬酯组	73.36±7.08#	32.27±3.45#
wortmannin组	25.16±2.05#△	76.08±7.96#△
shNrf2组	24.39±2.11#△	75.24±7.35#△
氟比洛芬酯＋wortmannin组	55.32±5.04△	43.16±4.10△
氟比洛芬酯＋shNrf2组	56.24±5.04△	42.34±4.22△
*F*值	366.070	218.442
*P*值	＜0.001	＜0.001

注：较对照组，*P＜0.01；较H/R组，#P＜0.01；较氟比洛芬酯组，△P＜0.01。Note: *vs* the control group, *P ＜ 0.01; *vs* the H/R group, #P ＜ 0.01; *vs* the flurbiprofen axetil group, △P ＜ 0.01.

表 3 各组细胞 SOD、MDA 及 TNF-α 水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

Table 3 Comparison of SOD, MDA and TNF-α levels in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	SOD（ng/L）	MDA（μmoL/L）	TNF-α（pg/mL）
对照组	2.33±0.25	3.47±0.32	10.32±1.02
H/R组	1.04±0.10*	10.38±1.04*	80.59±0.06*
氟比洛芬酯组	2.00±0.20#	4.40±0.25#	25.26±2.16#
wortmannin组	0.77±0.07#△	19.77±1.11#△	167.45±20.01#△
shNrf2组	0.75±0.06#△	20.58±2.23#△	150.59±19.33#△
氟比洛芬酯＋wortmannin组	1.59±0.11△	8.29±0.18△	100.35±18.33△
氟比洛芬酯＋shNrf2组	1.58±0.10△	8.35±0.22△	106.77±17.13△
*F*值	163.828	394.862	153.828
*P*值	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：较对照组，*P＜0.01；较H/R组，#P＜0.01；较氟比洛芬酯组，△P＜0.01。Note: *vs* the control group, *P ＜ 0.01; *vs* the H/R group, #P ＜ 0.01; *vs* the flurbiprofen axetil group, △P ＜ 0.01

2.4 氟比洛芬酯处理对神经元细胞氧化应激及炎症指标的影响

较对照组，H/R 组细胞抗氧化应激相关酶 SOD 水平降低（P ＜ 0.01），MDA 及 TNF-α 水平升高（P ＜ 0.01）。较 H/R 组，氟比洛芬酯组细胞 SOD 水平升高（P ＜ 0.01），MDA 及 TNF-α 水平降低（P ＜ 0.01）。wortmannin 组及 shNrf2 组细胞 SOD 水平较 H/R 组进一步降低（P ＜ 0.01），MDA 及 TNF-α 水平较 H/R 组进一步升高（P ＜ 0.01）。与氟比洛芬酯组相比，氟比洛芬酯＋ wortmannin 组及氟比洛芬酯＋ shNrf2 组细胞 SOD 水平降低（P ＜ 0.01），MDA 及 TNF-α 水平升高（P ＜ 0.01），见表 3。

2.5 氟比洛芬酯处理对神经元细胞 Akt/GSK-3β/Nrf2/HO-1 蛋白表达的影响

较对照组，H/R 组细胞 p-Akt/Akt、p-GSK-3β/GSK-3β、Nrf2、HO-1 蛋白表达升高（P ＜ 0.01）。与 H/R 组相比，氟比洛芬酯组细胞 p-Akt/Akt、p-GSK-3β/GSK-3β、Nrf2、HO-1 蛋白表达升高（P ＜ 0.01）。wortmannin 组及 shNrf2 组细胞 p-Akt/Akt、p-GSK-3β/GSK-3β、Nrf2、HO-1 蛋白表达较 H/R 组降低（P ＜ 0.01）。较氟比洛芬酯组，氟比洛芬酯＋ wortmannin 组及氟比洛芬酯＋ shNrf2 组细胞 p-Akt/Akt、p-GSK-3β/GSK-3β、Nrf2、HO-1 蛋白表达降低（P ＜ 0.01），见图 3、表 4。

3 讨论

缺血缺氧性脑病（hypoxic-ischemic encephalopathy，HIE）引起的神经元损伤是导致患者神经功能丢失的重要因素，探究神经元缺血缺氧的分子调控机制，可为 HIE 的治疗提供新的思路[11]。目前公认缺血缺氧条件下，炎症及氧化应激是导致神经元、组织细胞损伤或死亡的关键机制[12]。本研究建立体外 H/R 神经元细胞损伤模型后，发现神经元细胞线粒体及内质网结构损伤严重，神经元凋亡率升高的同时，氧化应激产物 MDA 及炎症因子 TNF-α 表达也明显升高，提示神经元 H/R 应激性损伤模型复制成功。

Nrf2 是一种重要的内源性抗应激调节因子，且在氧化应激反应中处于核心地位。研究显示，缺氧条件下，细胞质中的 Nrf2 可与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 解离，并由胞浆转入胞核，与抗氧化反应元件结合后，可调控大量具有抗炎作用的基因及蛋白表达，如Ⅱ相解毒酶或抗氧化酶 -SOD2 或 HO-1 等，来催化活性氧转化为无毒物质，并从细胞或机

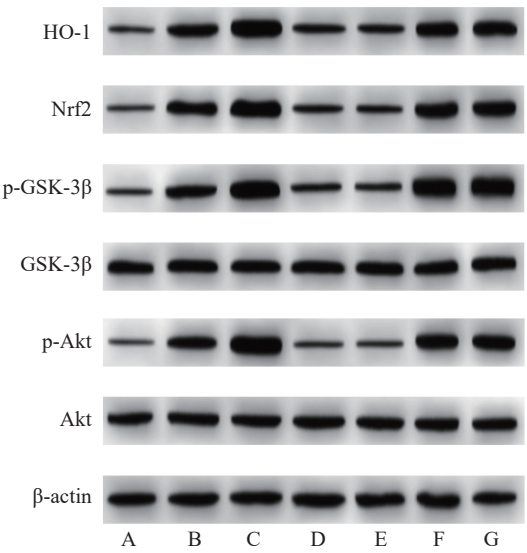
表 4 各组细胞 p-Akt/Akt、p-GSK-3β/GSK-3β、Nrf2、HO-1 蛋白表达比较（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

Table 4 Comparison of protein expressions of p-Akt/Akt, p-GSK-3β/GSK-3β, Nrf2 and HO-1 in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

组别	p-Akt/Akt	p-GSK-3β/GSK-3β	Nrf2	HO-1
对照组	0.33±0.02	0.43±0.04	0.30±0.04	0.37±0.03
H/R组	1.01±0.10*	1.08±0.09*	1.01±0.13*	0.98±0.09*
氟比洛芬酯组	2.06±0.18$^{\#}$	1.97±0.15$^{\#}$	1.86±0.18$^{\#}$	1.82±0.15$^{\#}$
wortmannin组	0.46±0.04$^{\#\triangle}$	0.58±0.06$^{\#\triangle}$	0.56±0.05$^{\#\triangle}$	0.68±0.06$^{\#\triangle}$
shNrf2组	0.49±0.05$^{\#\triangle}$	0.54±0.05$^{\#\triangle}$	0.59±0.04$^{\#\triangle}$	0.64±0.05$^{\#\triangle}$
氟比洛芬酯＋wortmannin组	1.42±0.14$^{\triangle}$	1.46±0.10$^{\triangle}$	1.39±0.14$^{\triangle}$	1.36±0.10$^{\triangle}$
氟比洛芬酯＋shNrf2组	1.44±0.14$^{\triangle}$	1.44±0.12$^{\triangle}$	1.34±0.13$^{\triangle}$	1.34±0.12$^{\triangle}$
*F*值	303.415	339.900	213.298	261.102
*P*值	＜0.001	＜0.001	＜0.001	＜0.001

注：较对照组，*$P<0.01$；较 H/R 组，$^{\#}P<0.01$；较氟比洛芬酯组，$^{\triangle}P<0.01$。

Note: *vs* the control group, *$P<0.01$; *vs* the H/R group, $^{\#}P<0.01$; *vs* the flurbiprofen axetil group, $^{\triangle}P<0.01$.



注：A：对照组；B：H/R 组；C：氟比洛芬酯组；D：wortmannin 组；E：shNrf2 组；F：氟比洛芬酯＋ wortmannin 组；G：氟比洛芬酯＋ shNrf2 组。

Note: A: control group; B: H/R group; C: flurbiprofen axetil group; D: wortmannin group; E: shNrf2 group; F: flurbiprofen axetil ＋ wortmannin group; G: flurbiprofen axetil ＋ shNrf2 group.

图 3 p-Akt、Akt、p-GSK-3β、GSK-3β、Nrf2、HO-1 蛋白表达

Figure 3 Expression of p-Akt, Akt, p-GSK-3β, GSK-3β, Nrf2 and HO-1 protein

体排出，而发挥抗应激保护作用[13]。HO-1 被认为是最易被 Nrf2 诱导的酶，缺氧应激刺激，HO-1 被 Nrf2 诱导活化后，可催化血红素降解为一氧化碳、胆绿素及铁离子等催化类物质，而发挥抗炎、抗氧化及抗凋亡作用[14]。本研究显示，神经元细胞经缺氧处理后，细胞 Nrf2 及 HO-1 表达呈应激性升高，而用短发夹 RNA 干扰技术下调 Nrf2 表达后，HO-1 表达降低，神经元细胞损伤及凋亡进一步加重，推测应激条件下，细胞 Nrf2 及 HO-1 的升高发挥强烈的抗损伤及抗凋亡作用。

近来研究显示，Nrf2 的入核活化，也受 Akt/GSK-3β 的调节。文献[15]显示，GSK-3β 可磷酸化 Nrf2 的 Neh6 结构域，并泛素化降解 Nrf2 而阻止 Nrf2 入核活化。且在应激刺激的早期，细胞自身的促生存途径磷脂酰肌醇 3- 激酶促进 Akt 磷酸化活化，发挥抗凋亡作用的同时，Akt 的磷酸化也促进 GSK-3β 磷酸化降解而失活，使 GSK-3β 降解 Nrf2 减弱，Nrf2 入核活化发挥抗应激保护作用增强[16]，而在应激作用后期，Akt 的磷酸化过程逐渐被抑制，活化的 GSK-3β 可磷酸化 Fyn 激酶并使其聚集于细胞核内，迫使 Nrf2 由核内转出，并被泛素化降解而减弱 Nrf2 的抗应激保护作用[17]。Xing 等[18]发现，用 GSK-3β 特效抑制剂或 GSK-3β 干扰技术抑制 GSK-3β 活性后，均可使 Nrf2 表达及核转位增强，而加强肝细胞应对外界刺激的耐受性。本研究 H/R 神经元细胞模型中，Nrf2/HO-1 途径活化的同时，Akt/GSK-3β

通路磷酸化蛋白表达也明显升高，而用 Akt/GSK-3β 通路抑制剂 wortmannin 抑制 Akt/GSK-3β 途径磷酸化活性的同时，Nrf2/HO-1 抗应激保护途径也明显降低，神经元细胞损伤及凋亡也明显加重，提示 Akt/GSK-3β 及 Nrf2/HO-1 途径共同参与 H/R 后神经元抗应激保护途径的调控过程。

氟比洛芬酯为非甾体类抗炎镇痛药，临床报导其对脑损伤术后患者应激反应影响非常显著，且能通过抗炎、抗氧化应激作用改善脑缺血后神经元细胞损伤及凋亡[19]，在脑保护治疗方面有潜在的临床价值。但氟比洛芬酯的抗脑缺血损伤的分子调控机制还不甚明确，这极不利于氟比洛芬酯的推广应用。本研究显示，一定浓度的氟比洛芬酯可明显降低缺氧复氧模型神经元细胞损伤及凋亡，且其发挥抗神经元应激性损伤及凋亡作用，可能与促进 Akt/GSK-3β 及 Nrf2/HO-1 途径活化有关。阻断 Akt/GSK-3β 或 Nrf2/HO-1 途径活性，均可同等程度减弱氟比洛芬酯发挥的抗神经元细胞损伤及凋亡作用。

4 结论

氟比洛芬酯可能通过促进 Akt/GSK-3β 及 Nrf2/HO-1 途径活化，以保护神经元免受 H/R 损伤。这为阐明氟比洛芬酯发挥脑保护作用的分子调控机制，及氟比洛芬酯的推广应用提供一定依据。但阻断 Akt/GSK-3β 或 Nrf2/HO-1 途径活性，均不能完全减弱氟比洛芬酯的神经元保护作用，预示氟比洛芬酯还可能通过其他途径发挥抗应激损伤作用，有待后续继续深入研究。

参考文献：

[1] Greco P, Nencini G, Piva I, *et al*. Pathophysiology of hypoxic-ischemic encephalopathy: a review of the past and a view on the future[J]. Acta Neurol Belg, 2020, 120(2): 277-288.

[2] Esih K, Goričar K, Rener-Primec Z, *et al*. CARD8 and IL-1B polymorphisms influence MRI brain patterns in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy treated with hypothermia[J]. Antioxidants(Basel), 2021, 10(1): 96-108.

[3] 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.

[4] Farhat F, Nofal S, Raafat EM, *et al*. Akt/GSK3β/Nrf2/HO-1 pathway activation by flurbiprofen protects the hippocampal neurons in a rat model of glutamate excitotoxicity[J]. Neuropharmacology, 2021, 15(196): 1086-1094.

[5] 祝瑜. 氟比洛芬酯对短暂性脑缺血再灌注大鼠模型炎症反应的影响[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(9): 4393-4399..

[6] 郭旭丽, 吕波. 氟比洛芬酯对脑损伤术后患者应激反应的影响分析[J]. 中国现代药物应用, 2020, 14(9): 112-114.

[7] 王涛, 汪凯, 李亚强, 等. 白藜芦醇对神经元缺氧复氧过程中细胞凋亡与氧化应激反应的影响[J]. 医药导报, 2020, 39(7): 914-917.

[8] 孙亮, 黑飞龙, 董彦鹏, 等. 缺血再灌注期间不同时相氟比洛芬酯处理对乳鼠心肌细胞钠电流的影响[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2014, 14(1): 802-806.

[9] Rosales-Soto G, Diaz-Vegas A, Casas M, *et al*. Fibroblast growth factor-21 potentiates glucose transport in skeletal muscle fibers[J]. J Mol Endocrinol, 2020, 20(1): 35-42.

[10] Huang W, Shi G, Yong Z, *et al*. Downregulation of RKIP promotes radioresistance of nasopharyngeal carcinoma by activating NRF2/NQO1 axis via downregulating miR-450b-5p[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(7): 504-518.

[11] Bonifacio SL, Hutson S. The term newborn: evaluation for hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Clin Perinatol, 2021, 48(3): 681-695.

[12] Zhang P, Wang Y, Wang H, *et al*. Sesamol alleviates chronic intermittent hypoxia-induced cognitive deficits via inhibiting oxidative stress and inflammation in rats[J]. Neuroreport, 2021, 32(2): 105-111.

[13] Fan S, Liu X, Wang Y, *et al*. Thymus quinquecostatus Cêlak. ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury via dual antioxidant actions: activating Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathway and directly scavenging ROS[J]. Phytomedicine, 2021, 91(1): 1536-1543.

[14] Ayaydin H, Akaltun İ, Koyuncu İ, *et al*. High KEAP1, NRF2 and low HO-1 serum levels in children with autism[J]. Noro Psikiyatr Ars, 2020, 57(4): 274-279.

[15] Ding Z, Wu X, Wang Y, *et al*. Melatonin prevents LPS-induced epithelial-mesenchymal transition in human alveolar epithelial cells via the GSK-3β/Nrf2 pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 132(1): 1108-1127.

（下转第 637 页）

sphingolipid metabolism defects[J]. Saudi J Biol Sci, 2020, 27(1): 324-334.

[13] 谭红金, 葛亮, 刘娜利, 等. 血液透析联合低频度血液灌流治疗慢性肾脏病患者矿物质及骨代谢异常[J]. 微循环学杂志, 2019, 29(1): 81-84.

[14] Ali MS, Ernst M, Robinson DE, *et al*. Alendronate use and bone mineral density gains in women with moderate-severe (stages 3B-5) chronic kidney disease: an open cohort multivariable and propensity score analysis from Funen, Denmark[J]. Arch Osteoporos, 2020, 15(1): 81.

[15] 张黎. 非布司他对维持性血液透析患者残余肾功能及炎性因子水平的影响[J]. 中国医药, 2020, 15(2): 276-279.

[16] 闫奇奇, 郝丽, 张森. 慢性肾脏病患者血清FGF23水平与钙磷代谢及临床相关性[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(5): 776-780.

[17] 龚淑文, 谢海英, 官继超, 等. 慢性肾脏病患者血清中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白与心血管事件相关性分析[J]. 中华内分泌外科杂志, 2019, 13(2): 154-158.

[18] 段培林, 张爱枝. 慢性肾脏病患者血清成纤维细胞生长因子23水平及其与冠状动脉钙化的关联研究[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(21): 3206-3208.

[19] 豆利军, 李耀增, 张顺国. 血清FGF-23水平变化与慢性肾病维持性血液透析患者冠状动脉钙化的相关性及其临床意义[J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(18): 1964-1967.

（编辑：虞　瑛）

（上接第573页）

[16] Niture SK, Khatri R, Jaiswal AK. Regulation of Nrf2 – an update[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 66(1): 36-44.

[17] Li H, Chen Y, Zhang J, *et al*. Shikonin attenuates acetaminophen-induced hepatotoxicity by upregulation of Nrf2 through Akt/GSK3β signaling[J]. Molecules, 2018, 24(1): 110-129.

[18] Xing HY, Cai YQ, Wang XF, *et al*. The cytoprotective effect of hyperoside against oxidative stress is mediated by the Nrf2 – ARE signaling pathway through GSK-3β inactivation[J]. PLoS One, 2015, 10(12): 1451-1483.

[19] Wu H, Tang C, Tai LW, *et al*. Flurbiprofen axetil attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by reducing inflammation in a rat model of transient global cerebral ischemia/reperfusion[J]. Biosci Rep, 2018, 38(4): 217-225.

（编辑：刘玲玲）