

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research基于 CCL2 - CCR2 通路探讨汉黄芩素对
缺氧复氧诱导神经元损伤的研究Research of wogonin on neuronal damage induced by hypoxia/reoxygenation based
on the CCL2 - CCR2 pathway李启超^{1a}, 刘媛媛^{1b}, 黄占^{1a}

(滕州市中心人民医院, a. 康复医学科; b. 神经内科, 山东 滕州 277500)

LI Qi - chao^a, LIU Yuan - yuan^b,
HUANG Zhan^a(a. Department of Rehabilitation
Medicine; b. Department of Neurology,
Tengzhou Central People's Hospital,
Tengzhou 277500, Shandong Province,
China)

基金项目: 徐州医科大学附属医院发展基金资助项目(XYFY202214)

作者简介: 李启超(1990 -)男, 主治医师, 主要从事脑卒中及卒中后康复评估方面的临床工作和研究

通信作者: 黄占, 主治医师
MP: 15564790919
E - mail: etyc79@163.com

摘要:目的 基于 C - C 趋化因子配体 2 - C - C 趋化因子受体 2 (CCL2 - CCR2) 通路探讨汉黄芩素对缺氧复氧 (H/R) 诱导神经元损伤的作用。方法 体外培养 PC12 细胞, 依次分为对照组 (常规培养)、模型组 (H/R 处理)、实验组 (H/R + 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 汉黄芩素预处理 1 h)、拮抗剂组 (H/R + 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CCR2 拮抗剂 RS102895 预处理 1 h) 和激动剂组 (H/R + 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 汉黄芩素 + 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CCL2 重组蛋白预处理 1 h)。用细胞计数试剂盒 - 8 (CCK - 8) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒检测细胞活力和毒性; 用膜联蛋白 V - 异硫氰酸荧光素/碘化丙啶 (Annexin V - FITC/PI) 双染法和脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记 (TUNEL) 染色法检测细胞凋亡; 用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法和实时荧光定量聚合酶链反应 (RT - qPCR) 法检测氧化应激和炎症反应; 用蛋白质印迹法检测 CCL2 - CCR2 信号通路相关蛋白表达。结果 对照组、模型组、实验组、拮抗剂组和激动剂组的 PC12 细胞活力分别为 0.89 ± 0.06 、 0.32 ± 0.04 、 0.69 ± 0.05 、 0.65 ± 0.07 和 0.46 ± 0.04 , SOD 活性分别为 (45.11 ± 3.02)、(10.05 ± 1.05)、(33.62 ± 3.15)、(30.15 ± 2.87) 和 (21.05 ± 2.17) $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$, Annexin V - FITC/PI 双染凋亡率分别为 (3.21 ± 0.68)%、(29.65 ± 1.59)%、(8.99 ± 0.82)%、(9.87 ± 0.85)% 和 (18.65 ± 1.06)%, TUNEL 阳性率分别为 (5.66 ± 0.89)%、(33.65 ± 2.42)%、(13.25 ± 1.05)%、(11.66 ± 1.87)% 和 (24.06 ± 1.16)%, 肿瘤坏死因子 - α (TNF α) mRNA 相对表达水平分别为 1.02 ± 0.15 、 3.05 ± 0.32 、 1.59 ± 0.16 、 2.98 ± 0.24 和 2.66 ± 0.20 , 白细胞介素 - 6 (IL - 6) mRNA 相对表达水平分别为 1.05 ± 0.12 、 4.54 ± 0.39 、 1.87 ± 0.15 、 1.75 ± 0.14 和 3.08 ± 0.32 , CCL2 mRNA 相对表达水平分别为 1.01 ± 0.07 、 3.99 ± 0.32 、 1.64 ± 0.15 、 3.90 ± 0.33 和 2.84 ± 0.23 , CCR2 mRNA 相对表达水平分别为 1.03 ± 0.10 、 5.21 ± 0.51 、 2.03 ± 0.26 、 2.11 ± 0.20 和 3.85 ± 0.32 , 磷酸化 (p) p65/p65 相对表达水平分别为 0.12 ± 0.02 、 0.75 ± 0.06 、 0.24 ± 0.03 、 0.22 ± 0.01 和 0.52 ± 0.05 , LDH 漏出率分别为 (18.32 ± 1.15)%、(58.64 ± 5.16)%、(29.02 ± 2.16)%、(26.98 ± 3.02)% 和 (40.24 ± 3.54)%, 丙二醛 (MDA) 含量分别为 (50.16 ± 5.24)、(169.65 ± 10.16)、(91.32 ± 7.12)、(86.21 ± 5.16) 和 (134.16 ± 11.87) $\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。模型组与对照组比较、实验组与模型组对比、拮抗剂组和激动剂组与实验组对比, 上述指标在统计学上差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。结论 汉黄芩素通过抑制 CCL2 - CCR2 信号通路对 H/R 诱导的神经元损伤具有保护作用。

关键词: 汉黄芩素; 缺氧复氧; 神经元损伤; C - C 趋化因子配体 2 - C - C 趋化因子受体 2 通路

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.10.006

中图分类号: R285.5 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2026)10-1384-07

Abstract: Objective To investigate the effect of wogonin on hypoxia/reoxygenation (H/R) – induced neuronal injury based on the C – C chemokine ligand 2 – C – C chemokine receptor 2 (CCL2 – CCR2) pathway. **Methods** PC12 cells were cultured and divided into five groups, control group (normal culture), model group (H/R injury), experimental group (H/R + 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ wogonin pretreatment for 1 h), antagonist group (H/R + 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CCR2 antagonist RS102895 pretreatment for 1 h), and agonist group (H/R + 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ wogonin + 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CCL2 recombinant protein pretreatment for 1 h). Cell viability and cytotoxicity were assessed using the cell counting kit – 8 (CCK – 8) and lactate dehydrogenase (LDH) assay kits. Apoptosis was detected by Annexin V – fluorescein isothiocyanate/propidium iodide (Annexin V – FITC/PI) double staining and terminal deoxynucleotidyl transferase – mediated dUTP nick – end labeling (TUNEL) staining. Oxidative stress and inflammatory responses were evaluated by enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) and quantitative real – time polymerase chain reaction (RT – qPCR). Protein expression levels related to the CCL2 – CCR2 signaling pathway were measured by Western blot. **Results** The viability of PC12 cells in control group, model group, experimental group, antagonist group and agonist group were 0.89 ± 0.06 , 0.32 ± 0.04 , 0.69 ± 0.05 , 0.65 ± 0.07 and 0.46 ± 0.04 , respectively; the SOD activities were (45.11 ± 3.02), (10.05 ± 1.05), (33.62 ± 3.15), (30.15 ± 2.87) and (21.05 ± 2.17) $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the Annexin V FITC/PI double staining apoptosis rates were (3.21 ± 0.68)%, (29.65 ± 1.59)%, (8.99 ± 0.82)%, (9.87 ± 0.85)% and (18.65 ± 1.06)%, respectively; the TUNEL positive rates were (5.66 ± 0.89)%, (33.65 ± 2.42)%, (13.25 ± 1.05)%, (11.66 ± 1.87)% and (24.06 ± 1.16)%, respectively; the relative expression levels of tumor necrosis factor – alpha ($TNF - \alpha$) mRNA were 1.02 ± 0.15 , 3.05 ± 0.32 , 1.59 ± 0.16 , 2.98 ± 0.24 and 2.66 ± 0.20 , respectively; the relative expression levels of interleukin – 6 ($IL - 6$) mRNA were 1.05 ± 0.12 , 4.54 ± 0.39 , 1.87 ± 0.15 , 1.75 ± 0.14 and 3.08 ± 0.32 , respectively; the relative expression levels of CCL2 mRNA were 1.01 ± 0.07 , 3.99 ± 0.32 , 1.64 ± 0.15 , 3.90 ± 0.33 and 2.84 ± 0.23 , respectively; the relative expression levels of CCR2 mRNA were 1.03 ± 0.10 , 5.21 ± 0.51 , 2.03 ± 0.26 , 2.11 ± 0.20 and 3.85 ± 0.32 , respectively; the relative expression levels of phosphorylation (p)p65/p65 were 0.12 ± 0.02 , 0.75 ± 0.06 , 0.24 ± 0.03 , 0.22 ± 0.01 and 0.52 ± 0.05 , respectively; the leakage rates of LDH were (18.32 ± 1.15)%, (58.64 ± 5.16)%, (29.02 ± 2.16)%, (26.98 ± 3.02)% and (40.24 ± 3.54)%, respectively; the malondialdehyde (MDA) contents were (50.16 ± 5.24), (169.65 ± 10.16), (91.32 ± 7.12), (86.21 ± 5.16) and (134.16 ± 11.87) $\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The differences of above indicators between model group and control group, between experimental group and model group, and between the antagonist, agonist group and experimental group were all statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion**

Wogonin exerts a protective effect against H/R – induced neuronal injury by inhibiting the CCL2 – CCR2 signaling pathway.

Key words: wogonin; hypoxia/reoxygenation; neuronal damage; C – C chemokine ligand 2 – C – C chemokine receptor 2 pathway

缺血性脑血管疾病是全球致死致残的主要神经系统疾病,其核心病理为脑缺血损伤,该过程触发神经元氧化损伤、炎症反应等多个级联反应^[1]。目前,临床以恢复血流为主,但再灌注会再一次加剧神经元损伤^[2]。因此,探索针对性神经保护药物极具临床价值。神经元损伤是缺血再灌注损伤的核心环节,其发生发展与多种信号通路的异常激活密切相关。研究表明,在脑缺血再灌注的急性期,趋化因子配体 2 (C – C chemokine ligand 2, CCL2) 及其受体 C – C 趋化因子受体 2 (C – C chemokine

receptor 2, CCR2) 在缺血半暗区表达显著增加,其表达水平与炎症因子释放、氧化应激反应增强及神经元凋亡加剧密切相关^[3]。汉黄芩素是从黄芩中提取的黄酮类化合物,通过其抗氧化和抗凋亡作用,减轻创伤性脑损伤诱发的海马损伤^[4]。基于此,本研究通过建立缺氧复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 诱导的神经细胞 PC12 细胞损伤模型,探讨汉黄芩素对神经元损伤的保护作用及与 CCL2 – CCR2 通路的关系,为缺血性脑血管疾病的治疗提供新的实验参考。

材料与方法

1 材料

细胞 PC12 细胞 (CRL - 1721.1), 购自美国 ATCC 细胞库。

药品与试剂 汉黄芩素, 规格: 每支 20 mg, 纯度: 99.92%, 批号: HY - N0400、CCR2 拮抗剂 RS102895, 规格: 每支 20 mg, 纯度: 99.97%, 批号: HY - 18611A、细胞计数试剂盒 - 8 (cell counting kit - 8, CCK - 8) 检测试剂盒、膜联蛋白 V - 异硫氰酸荧光素/碘化丙啉 (Annexin V - fluorescein isothiocyanate/propidium iodide, Annexin V - FITC/PI), 凋亡检测试剂盒、末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记 (terminal deoxynucleotidyl transferase - mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 染色试剂盒, 均由美国 MCE 公司生产; CCL2 重组蛋白, 规格: 每支 50 μg , 纯度: >95%, 批号: 202524A, 北京 Sino Biological 公司生产; 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、NAD(P)H: 醌氧化还原酶 1 [NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1, NQO - 1] 及丙二醛 (malondialdehyde, MDA), 均由湖北武汉菲恩试剂公司生产; 兔抗 CCL2、CCR2、SOD、NQO - 1 及 MDA, 均由美国 CST 公司生产; 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒, 上海翌圣公司生产; 总核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 提取试剂盒和反转录试剂盒和实时荧光定量聚合酶链反应 (real - time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT - qPCR) 检测试剂盒, 均由上海阿拉丁公司生产。

仪器 SpectraMax M5 多功能酶标仪, 云南莱博科技公司产品; Beckman CytoFlex 流式细胞仪, 江苏贝克曼库尔特公司产品; BX53 显微镜, 日本奥林巴斯仪器公司产品; ABI QuantStudio 1 Plus PCR 仪器, 美国赛默飞科技公司产品; GenoSens 2000 凝胶成像仪, 上海勤翔科技公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养、分组与处理方法^[5]

PC12 细胞用高糖杜尔贝科改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 培养基于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中培养, 待融合度达 70% ~ 80% 时, 将其分为 5 组, 对照组细胞常规培养; 模型组细胞经 H/R 处理; 实验组细胞在缺氧前 1 h 加入终浓度为 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的汉黄芩素预处理^[5] (依据前期相关文献报道, 此浓度对正常 PC12 细胞无明显毒性), 随后

进行 H/R 处理; 拮抗剂组细胞在缺氧前 1 h 加入终浓度为 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 RS102895 预处理^[6], 随后用 H/R 处理; 激动剂组细胞在缺氧前 1 h 加入终浓度为 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的汉黄芩素和 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CCL2 重组蛋白预处理^[7], 随后用 H/R 处理。H/R 处理方法: 将细胞更换为无糖无血清 DMEM 培养基, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、95% N_2 + 5% CO_2 的缺氧培养箱中缺氧培养 6 h, 随后更换为正常 DMEM 培养基, 置于正常培养箱中复氧 24 h^[8]。所有细胞均处理 48 h 后进行后续研究。

2.2 CCK - 8 法检测各组 PC12 细胞活力^[9]

将对数生长期的 PC12 细胞以每孔 5×10^3 个的密度接种于 96 孔板中, 按上述分组进行处理后, 添加 CCK - 8 试剂 10 μL 孵育 2 h。用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的光密度 (optical density, OD)。

2.3 LDH 试剂盒法检测各组 PC12 细胞毒性^[10]

将 PC12 细胞以每孔 2×10^4 个的密度接种于 24 孔板中, 分组处理后, 收集各孔上清液, 严格按照 LDH 检测试剂盒说明书操作, 根据标准曲线结合各孔检测的 OD 值计算 LDH 漏出率。

2.4 Annexin V - FITC/PI 双染流式细胞术法检测各组 PC12 细胞凋亡率^[11]

将 PC12 细胞以每孔 5×10^5 个接种于 6 孔板中, 分组处理后, 收集细胞悬液。添加结合缓冲液 100 μL 重悬细胞, 加入 Annexin V - FITC 和 PI 溶液 5 μL , 避光孵育 15 min, 补充结合缓冲液 400 μL 后, 用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.5 TUNEL 染色法检测各组 PC12 细胞 TUNEL 阳性细胞率^[11]

将 PC12 细胞以每孔 1×10^4 个接种于 24 孔板, 分组处理后, 用多聚甲醛固定, 添加 Triton X - 100 透化处理 10 min; 严格按照 TUNEL 染色试剂盒说明书添加反应液避光处理 60 min, 随后用 4', 6 - 二脒基 - 2 - 苯基吲哚染核 5 min。用荧光显微镜观察, 并对 TUNEL 阳性细胞数和总细胞数进行计数。

2.6 酶联免疫吸附法 (enzyme - linked immunosorbent assay, ELISA) 检测各组 PC12 细胞氧化应激指标^[9]

将 PC12 细胞以每孔 1×10^6 个接种于 6 孔板中, 分组处理后收集细胞。严格按照 SOD、NQO - 1 和 MDA 检测试剂盒说明书操作, 分别在对应波长处测定 OD 值, 结合标准曲线计算各指标的含量或活性。

2.7 RT - qPCR 法检测各组 PC12 细胞炎症因子 mRNA 表达水平^[12]

将 PC12 细胞以每孔 1×10^6 个接种于 6 孔板中,

分组处理后收集细胞。用总 RNA 提取试剂盒提取各组细胞总 RNA, 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 通过基因上下游引物进行 RT-qPCR 反应。以 *GAPDH* 为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 算法进行分析, 计算肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , *TNF*- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, *IL*-6)、*CCL2* 和 *CCR2* mRNA 相对表达水平。*TNF*- α 上游引物: 5'-GCGTGTTCATCCGTTCTCTACC-3', 下游引物: 5'-TACTTCAGCGTCTCGTGTGTTTCT-3'; *IL*-6 上游引物: 5'-AGTTGCCTTCTTGGGACTGATGT-3', 下游引物: 5'-GGTCTGTTGTGGGTGGTATCCTC-3'; *CCL2* 上游引物: 5'-GTGTCCCAAAGAAGCTGTGA-3', 下游引物: 5'-AATCCTGAACCCACTTCTGC-3'; *CCR2* 上游引物: 5'-GACCAGGAAAGAATGTGAAAGTG-3', 下游引物: 5'-GCTCTGCCAATTGACTTTCCTT-3'; *GAPDH* 上游引物: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', 下游引物: 5'-CGCCTGCTTCACCACCTTCTT-3'。

2.8 蛋白质印迹法检测各组细胞 *CCL2*-*CCR2* 信号通路相关蛋白表达^[10]

将 PC12 细胞以每孔 1×10^6 个接种于 6 孔板中, 分组处理后收集细胞, 用放射免疫沉淀测定裂解缓冲液裂解、离心获取上清液, 取等量样品变性后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后, 将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上, 封闭 2 h 后添加 *CCL2* (1:1 000)、*CCR2* (1:1 000)、磷酸化 (phosphorylation, p)-p65 (1:1 000)、p65 (1:1 000) 和 *GAPDH* (1:5 000) 一抗过夜培养。加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:5 000) 再次孵育 2 h 后显影, 用 ImageJ 软件分析各蛋白条带的灰度值。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较用单因素方差分析和 *LSD-t* 检验。

结 果

1 汉黄芩素缓解 H/R 诱导的 PC12 细胞活力下降并减少 LDH 释放

与对照组相比, 模型组的 PC12 细胞活力显著降低, LDH 漏出率显著升高 (均 $P < 0.05$); 与模型组相比, 实验组和拮抗剂组的 PC12 细胞活力均显著升高, LDH 漏出率均显著降低 (均 $P < 0.05$); 与实验组相比, 激动剂组的 PC12 细胞活力显著降低, LDH 漏出率显著升高 (均 $P < 0.05$), 拮抗剂组的 PC12 细胞活力

及 LDH 漏出率在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 见表 1。

表 1 各组 PC12 细胞活力及乳酸脱氢酶 (LDH) 漏出率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of cell viability and lactate dehydrogenase (LDH) leakage rate of PC12 cells in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Cell viability	LDH leakage rate (%)
Control	8	0.89 $\pm$ 0.06	18.32 $\pm$ 1.15
Model	8	0.32 $\pm$ 0.04 [*]	58.64 $\pm$ 5.16 [*]
Experimental	8	0.69 $\pm$ 0.05 [#]	29.02 $\pm$ 2.16 [#]
Antagonist	8	0.65 $\pm$ 0.07 [#]	26.98 $\pm$ 3.02 [#]
Agonist	8	0.46 $\pm$ 0.04 ^{&}	40.24 $\pm$ 3.54 ^{&}

Control group: Routine culture; Model group: Hypoxia/reoxygenation treatment; Experimental group: Pretreatment with wogonin at a final concentration of 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 1 h before H/R; Antagonist group: Pretreatment with RS102895 at a final concentration of 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 1 h before H/R; Agonist group: Pretreatment with wogonin (50 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and *CCL2* recombinant protein (20 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) for 1 h before H/R; Compared with control group, ^{*} $P < 0.05$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$; Compared with experimental group, [&] $P < 0.05$.

2 汉黄芩素抑制 H/R 诱导的 PC12 细胞凋亡

与对照组相比, 模型组 PC12 细胞的 Annexin V-FITC/PI 双染凋亡率及 TUNEL 阳性率均显著升高 (均 $P < 0.05$); 与模型组相比, 实验组和拮抗剂组 PC12 细胞的 Annexin V-FITC/PI 双染凋亡率及 TUNEL 阳性率均显著降低 (均 $P < 0.05$); 与实验组比较, 激动剂组 PC12 细胞的 Annexin V-FITC/PI 双染凋亡率及 TUNEL 阳性率均显著升高 (均 $P < 0.05$), 拮抗剂组 PC12 细胞的 Annexin V-FITC/PI 双染凋亡率及 TUNEL 阳性率在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 见表 2 和图 1。

3 汉黄芩素缓解 H/R 诱导的 PC12 细胞氧化应激

与对照组相比, 模型组 PC12 细胞的 SOD 和 NQO-1 活性均显著降低, MDA 含量显著升高 (均 $P < 0.05$); 与模型组相比, 实验组、拮抗剂组 PC12 细胞的 SOD 和 NQO-1 活性均显著升高, MDA 含量显著降低 (均 $P < 0.05$); 与实验组比较, 激动剂组 PC12 细胞的 SOD 和 NQO-1 活性均显著降低, MDA 含量显著升高 (均 $P < 0.05$), 拮抗剂组 PC12 细胞的 SOD 和 NQO-1 活性及 MDA 含量在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 见表 3。

4 汉黄芩素抑制 H/R 诱导的 PC12 细胞炎症因子 mRNA 表达水平

与对照组相比, 模型组 PC12 细胞的 *TNF*- α 、*IL*-6、*CCL2* 和 *CCR2* mRNA 相对表达水平均显著升

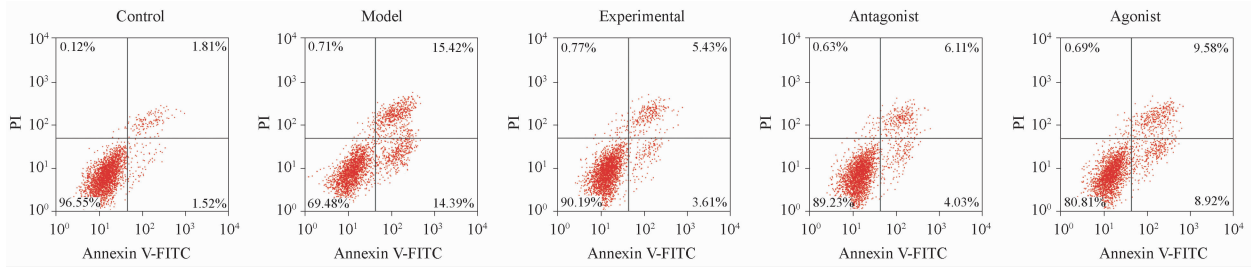


图 1 流式细胞术检测各组 PC12 细胞凋亡率

Figure 1 The apoptosis rates in PC12 cells of each group detected by flow cytometry

表 2 各组 PC12 细胞膜联蛋白 V - 异硫氰酸荧光素/碘化丙啉 (Annexin V - FITC/PI) 双染凋亡率及末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记 (TUNEL) 阳性率的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of apoptosis rate of Annexin V - fluorescein isothiocyanate/propidium iodide (Annexin V - FITC/PI) double staining and terminal deoxynucleotidyl transferase - mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) positive rate of PC12 cells in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Annexin V - FITC/PI apoptosis rate(%)	TUNEL positive rate(%)
Control	8	3. 21 $\pm$ 0. 68	5. 66 $\pm$ 0. 89
Model	8	29. 65 $\pm$ 1. 59 *	33. 65 $\pm$ 2. 42 *
Experimental	8	8. 99 $\pm$ 0. 82 [#]	13. 25 $\pm$ 1. 05 [#]
Antagonist	8	9. 87 $\pm$ 0. 85 [#]	11. 66 $\pm$ 1. 87 [#]
Agonist	8	18. 65 $\pm$ 1. 06 ^{&}	24. 06 $\pm$ 1. 16 ^{&}

Compared with control group, * $P < 0. 05$; Compared with model group, [#] $P < 0. 05$; Compared with experimental group, [&] $P < 0. 05$.

高(均 $P < 0. 05$);与模型组相比,实验组、拮抗剂组 PC12 细胞的 $TNF - \alpha$ 、 $IL - 6$ 、 $CCL2$ (仅实验组)和 $CCR2$ mRNA 相对表达水平均显著降低(均 $P < 0. 05$);与实验组比较,激动剂组 PC12 细胞的 $TNF - \alpha$ 、 $IL - 6$ 、 $CCL2$ 和 $CCR2$ mRNA 相对表达水平均显著升高(均 $P < 0. 05$),拮抗剂组 PC12 细胞的 $TNF - \alpha$ 、 $IL - 6$ 、 $CCL2$ 和 $CCR2$ mRNA 相对表达水平在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0. 05$),见表 4。

5 汉黄芩素抑制 H/R 诱导的 PC12 细胞 CCL2 - CCR2 信号通路的激活

与对照组相比,模型组 PC12 细胞的 CCL2、CCR2 和 p - p65/p65 蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0. 05$);与模型组相比,实验组、拮抗剂组 PC12 细胞的 CCL2 (仅实验组)、CCR2 和 p - p65/p65 蛋白相

表 3 各组 PC12 细胞超氧化物歧化酶(SOD)、NAD(P)H: 醌氧化还原酶 1(NQO - 1)活性及丙二醛(MDA)含量的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of superoxide dismutase(SOD), NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1(NQO - 1) activities and malondialdehyde (MDA) content of PC12 cells in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	n	SOD(U $\cdot$ mL ⁻¹)	NQO - 1(ng $\cdot$ mL ⁻¹)	MDA(nmol $\cdot$ mL ⁻¹)
Control	8	45. 11 $\pm$ 3. 02	34. 16 $\pm$ 3. 05	50. 16 $\pm$ 5. 24
Model	8	10. 05 $\pm$ 1. 05 *	6. 25 $\pm$ 0. 98 *	169. 65 $\pm$ 10. 16 *
Experimental	8	33. 62 $\pm$ 3. 15 [#]	26. 16 $\pm$ 2. 02 [#]	91. 32 $\pm$ 7. 12 [#]
Antagonist	8	30. 15 $\pm$ 2. 87 [#]	25. 87 $\pm$ 1. 64 [#]	86. 21 $\pm$ 5. 16 [#]
Agonist	8	21. 05 $\pm$ 2. 17 ^{&}	18. 65 $\pm$ 1. 20 ^{&}	134. 16 $\pm$ 11. 87 ^{&}

Compared with control group, * $P < 0. 05$; Compared with model group, [#] $P < 0. 05$; Compared with experimental group, [&] $P < 0. 05$.

表 4 各组 PC12 细胞的肿瘤坏死因子 - α ($TNF - \alpha$)、白细胞介素 - 6 ($IL - 6$)、趋化因子配体 2 ($CCL2$) 和 C - C 趋化因子受体 2 ($CCR2$) mRNA 相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of the relative expression levels of tumor necrosis factor - alpha ($TNF - \alpha$), interleukin - 6 ($IL - 6$), C - C chemokine ligand 2 ($CCL2$) and C - C chemokine receptor 2 ($CCR2$) mRNA in PC12 cells of each group($\bar{x} \pm s$)

Group	n	$TNF - \alpha$ mRNA	$IL - 6$ mRNA	$CCL2$ mRNA	$CCR2$ mRNA
Control	8	1. 02 $\pm$ 0. 15	1. 05 $\pm$ 0. 12	1. 01 $\pm$ 0. 07	1. 03 $\pm$ 0. 10
Model	8	3. 05 $\pm$ 0. 32 *	4. 54 $\pm$ 0. 39 *	3. 99 $\pm$ 0. 32 *	5. 21 $\pm$ 0. 51 *
Experimental	8	1. 59 $\pm$ 0. 16 [#]	1. 87 $\pm$ 0. 15 [#]	1. 64 $\pm$ 0. 15 [#]	2. 03 $\pm$ 0. 26 [#]
Antagonist	8	2. 98 $\pm$ 0. 24	1. 75 $\pm$ 0. 14 [#]	3. 90 $\pm$ 0. 33	2. 11 $\pm$ 0. 20 [#]
Agonist	8	2. 66 $\pm$ 0. 20 ^{&}	3. 08 $\pm$ 0. 32 ^{&}	2. 84 $\pm$ 0. 23 ^{&}	3. 85 $\pm$ 0. 32 ^{&}

Compared with control group, * $P < 0. 05$; Compared with model group, [#] $P < 0. 05$; Compared with experimental group, [&] $P < 0. 05$.

对表达水平均显著降低(均 $P < 0.05$);与实验组比较,激动剂组 PC12 细胞的 CCL2、CCR2 和 p - p65/p65 蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.05$),拮抗剂组 PC12 细胞的 CCL2、CCR2 和 p - p65/p65 蛋白相对表达水平在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表 5 和图 2。

表 5 各组 PC12 细胞的 CCL2、CCR2 和磷酸化(p) - p65/p65 蛋白相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of the relative expression levels of CCL2, CCR2 and phosphorylation(p) - p65/p65 protein in PC12 cells of each group($\bar{x} \pm s$)

Group	n	CCL2	CCR2	p - p65/p65
Control	8	0.24 ± 0.03	0.32 ± 0.04	0.12 ± 0.02
Model	8	0.87 ± 0.05 *	0.85 ± 0.05 *	0.75 ± 0.06 *
Experimental	8	0.39 ± 0.02 #	0.50 ± 0.04 #	0.24 ± 0.03 #
Antagonist	8	0.80 ± 0.04	0.47 ± 0.06 #	0.22 ± 0.01 #
Agonist	8	0.65 ± 0.06 &	0.71 ± 0.06 &	0.52 ± 0.05 &

Compared with control group, * $P < 0.05$; Compared with model group, # $P < 0.05$; Compared with experimental group, & $P < 0.05$.

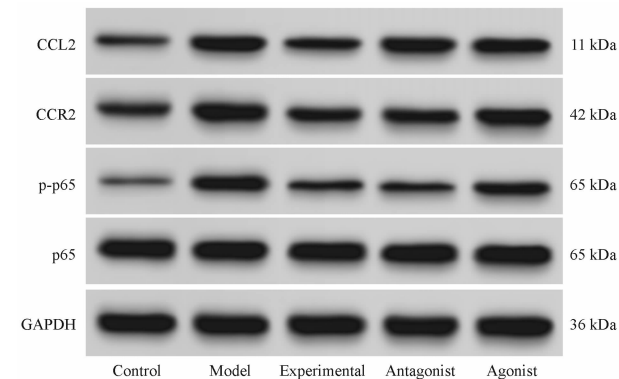


图 2 蛋白质印迹法检测各组 PC12 细胞的 CCL2、CCR2 及 p - p65/p65 蛋白相对表达水平

Figure 2 The relative expression levels of CCL2, CCR2 and p - p65/p65 proteins in PC12 cells from each group detected by Western blot

讨 论

PC12 细胞是具有神经内分泌细胞特征,增殖能力强、培养条件相对简单,广泛用于神经生理学和药理学研究^[13]。此外,已有研究证实,H/R 诱导的 PC12 细胞损伤模型能较好模拟脑缺血再灌注过程中的神经元病理变化,是研究神经元缺血再灌注损伤的理想体外模型^[5,13]。因此,本研究通过 H/R 诱导 PC12 细胞建立损伤模型,为探讨汉黄芩素的神经保护作用提供了可靠的实验基础。

汉黄芩素是传统中药黄芩的一种活性成分,CHENG 等^[14]研究发现,其可以通过激活单磷酸腺苷激活蛋白激酶(AMP - activated protein kinase, AMPK)/沉默信息调节因子 1(silent information regulator 2 homolog 1, SIRT1)通路并抑制 NOD 样受体热

蛋白结构域相关蛋白 3(NOD - like receptor family pyrin domain - containing protein 3, NLRP3)炎症小体,缓解脑缺血再灌注后的神经炎症,进而改善神经功能缺损并发挥脑保护作用;FENG 等^[4]则证实,汉黄芩素通过激活磷脂酰肌醇 3 - 激酶(phosphoinositide 3 - kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)/核因子红系 2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2 - related factor 2, Nrf2)/血红素加氧酶 - 1(heme oxygenase - 1, HO - 1)信号通路调控凋亡蛋白水平,上调 B 细胞淋巴瘤/白血病 - 2(B - cell lymphoma/leukemia - 2, Bcl - 2)、抑制 Bcl - 2 相关 X 蛋白(Bcl - 2 - associated X protein, Bax)和 caspase - 3,减轻创伤性脑损伤后的神经元凋亡。本研究显示,H/R 处理可以显著降低 PC12 细胞活力,增加 LDH 漏出、细胞凋亡、氧化应激(SOD、NQO - 1 活性降低,MDA 升高)及炎症因子(TNF - α 、IL - 6 mRNA)表达,汉黄芩素预处理可以有效逆转上述指标变化,提示其通过改善细胞膜完整性、抑制凋亡、减轻氧化应激与炎症反应发挥神经保护作用,与 BIAN 等^[15]报道的汉黄芩素抗氧化作用一致。

CCL2 - CCR2 通路是调控炎症反应以及细胞损伤的关键信号通路,其激活机制主要体现在 CCL2 配体与 CCR2 受体结合后通过 G 蛋白偶联受体信号传导激活下游核因子 κ B(nuclear factor kappa - B, NF - κ B)通路,促使 p65 蛋白发生磷酸化,进而促进炎症因子等靶基因的表达^[16]。已有研究表明,CCL2 - CCR2 通路在脑缺血损伤中扮演关键角色,缺血脑组织中 CCL2 和 CCR2 相对表达水平均显著升高,且其表达水平与神经功能缺损程度有关^[17]。本研究显示,H/R 培养后,PC12 细胞的 CCL2、CCR2 及 p - p65/p65 相对表达水平均显著升高,表明 H/R 可以激活 CCL2 - CCR2/NF - κ B 通路;而通过汉黄芩素预处

理后,上述指标水平均被逆转,提示汉黄芩素可抑制该通路的激活。为进一步证实 CCL2 - CCR2 通路在汉黄芩素神经保护作用中的介导作用,本研究引入了 CCR2 拮抗剂 RS102895 和 CCL2 重组蛋白进行深入探究。结果表明,CCR2 拮抗剂 RS102895 可以产生与汉黄芩素相似的神经保护作用,进一步证实,阻断 CCL2 - CCR2 通路是关键机制。然而,2 者在作用环节上存在差异,RS102895 通过直接拮抗 CCR2 受体阻断下游信号,并不影响上游 CCL2 表达;而汉黄芩素则能够同时抑制 CCL2 及其受体 CCR2 表达,提示其可能作用于更上游的调控节点,这种差异说明,抑制 CCL2 - CCR2 通路可以在不同环节实现,也提示汉黄芩素的作用机制可能更为多靶点。而汉黄芩素与 CCL2 重组蛋白共同处理则可逆转汉黄芩素的神经保护作用,进一步证实汉黄芩素是通过抑制 CCL2 - CCR2 通路发挥保护作用的。

本研究提示,汉黄芩素抑制 CCL2 - CCR2 通路减轻氧化应激和炎症反应、抑制细胞凋亡,从而在体外对 H/R 诱导的 PC12 细胞损伤发挥神经保护作用。

参考文献:

- [1] YANG K, ZENG L, GE A, *et al.* A systematic review of the research progress of non - coding RNA in neuroinflammation and immune regulation in cerebral infarction/ischemia - reperfusion injury[J]. *Front Immunol*, 2022, 13(17):930171—930185.
- [2] ZHANG Q, JIA M, WANG Y, *et al.* Cell death mechanisms in cerebral ischemia - reperfusion injury[J]. *Neurochem Res*, 2022, 47(12):3525—3542.
- [3] GENG H, CHEN L, TANG J, *et al.* The role of CCL2/CCR2 axis in cerebral ischemia - reperfusion injury and treatment: From animal experiments to clinical trials[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(7):3485—3501.
- [4] FENG Y, JU Y, YAN Z, *et al.* Protective role of wogonin following traumatic brain injury by reducing oxidative stress and apoptosis *via* the PI3K/Nrf2/HO1 pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2022, 49(4):53—66.
- [5] LI L, GONG J, ZHANG W. Treatment of intracerebral hemorrhage with traditional Chinese medicine monomer wogonin by modifying NLRP3 with METTL14 to inhibit neuronal cell pyroptosis[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2024, 196(9):6174—6188.
- [6] FANG J, YUAN Q, DU Z, *et al.* Overexpression of GPX4 attenuates cognitive dysfunction through inhibiting hippocampus ferroptosis and neuroinflammation after traumatic brain injury[J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 204(15):68—81.
- [7] ISHIHARA N, KOMA Y I, OMORI M, *et al.* Chemokine (C - C Motif) ligand 2/CCR2/extracellular signal - regulated kinase signal induced through cancer cell - macrophage interaction contributes to hepatocellular carcinoma progression[J]. *Am J Pathol*, 2025, 195(3):589—608.
- [8] GAO Y, LI L, YU J, *et al.* Rosuvastatin protects PC12 cells from hypoxia/reoxygenation - induced injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress - induced apoptosis[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(4):1189—1204.
- [9] GAO N, HUANG Z, XIE J, *et al.* Cryptotanshinone alleviates cerebral ischemia reperfusion injury by regulating ferroptosis through the PI3K/AKT/Nrf2 and SLC7A11/GPX4 signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 348(21):119800—119824.
- [10] ZOU Z, YANG X, AN G, *et al.* miR - 218a - 5p derived from neural stem cell - exosomes inhibits ferroptosis in spinal cord injury through the Bmi1/Mettl3/Alox12 axis[J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 330(Pt 2):147981—147997.
- [11] WANG Y, YUAN H, SHEN D, *et al.* Artemisinin attenuated ischemic stroke induced pyroptosis by inhibiting ROS/TXNIP/NLRP3/Caspase - 1 signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 177(21):116894—117908.
- [12] WANG D, WANG X, WU Y, *et al.* miR - 29c - 3p downregulation accelerates spinal cord injury progression by targeting BRD4[J]. *J Orthop Surg Res*, 2025, 20(1):703—721.
- [13] LAN X, WANG Q, LIU Y, *et al.* Isoliquiritigenin alleviates cerebral ischemia - reperfusion injury by reducing oxidative stress and ameliorating mitochondrial dysfunction *via* activating the Nrf2 pathway[J]. *Redox Biol*, 2024, 77(21):103406—103420.
- [14] CHENG Z, TU J, WANG K, *et al.* Wogonin alleviates NLRP3 inflammasome activation after cerebral ischemia - reperfusion injury by regulating AMPK/SIRT1[J]. *Brain Res Bull*, 2024, 207(22):110886—110899.
- [15] BIAN B, GE C, WU F, *et al.* Wogonin attenuates bleomycin - induced pulmonary fibrosis and oxidative stress injury *via* the MAPK signaling pathway [J]. *Biol Pharm Bull*, 2024, 47(12):2165—2172.
- [16] YAO Y, WU Q, YUAN K, *et al.* Bindarit attenuates neuroinflammation after subarachnoid hemorrhage by regulating the CCL2/CCR2/NF - κ B pathway[J]. *Brain Res Bull*, 2025, 220(21):111183—111196.
- [17] 翟春晓, 田平, 李豪, 等. 甲基莲心碱通过调节 CCL2 - CCR2 信号通路对缺血性脑卒中大鼠血脑屏障的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2024, 40(6):1166—1171.

(本文编辑:马凌云 收稿日期 2025 - 11 - 10)