

# 丹酚酸 A 对 OGD/R 诱导脑微血管内皮细胞凋亡和氧化应激损伤的作用及机制

尚宇夫, 刘漫, 刘冬妮, 张文芳, 冯丹虹, 徐双, 冯琬迪, 杜冠华\*, 王月华\* (中国医学科学院药物研究所, 药物靶点研究与新药筛选北京市重点实验室, 北京 100050)

**摘要:**目的 研究丹酚酸 A (salvianolic acid A, SAL-A) 对氧糖剥夺/复氧 (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 诱导脑微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cells, b. End. 3) 凋亡和氧化应激损伤的作用及机制。方法 应用 b. End. 3 细胞 OGD/R 损伤模型评价 SAL-A 对 OGD/R 诱导 b. End. 3 细胞凋亡和氧化应激的作用及机制。膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素探针 (Annexin V-fluorescein isothiocyanate, Annexin V-FITC) 以及碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色检测细胞凋亡; 2,7-二氯荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 探针检测细胞活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成; JC-1 染色法检测细胞线粒体膜电位; 以免疫印迹法检测细胞凋亡、氧化应激及蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) / 糖原合成酶激酶-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK3 $\beta$ ) / 核转录因子 E2 相关因子 (nuclear factor erythroid 2 related factor 2, Nrf2) 通路相关蛋白的表达。结果 与正常对照组比较, OGD/R 组抗凋亡蛋白表达、线粒体膜电位水平、相关抗氧化蛋白表达、Akt/GSK3 $\beta$ /Nrf2 通路表达均显著降低 ( $P < 0.05$ ), 而细胞凋亡数、凋亡诱导蛋白表达、细胞内 ROS 产生均显著增高 ( $P < 0.05$ ); 而 SAL-A 处理后可改善 OGD/R 诱导的细胞凋亡和氧化应激, Akt/GSK3 $\beta$ /Nrf2 通路蛋白表达显著增高。结论 SAL-A 能够抑制 OGD/R 所诱导的脑微血管内皮细胞凋亡与氧化应激损伤, 机制与调控 Akt/GSK3 $\beta$ /Nrf2 通路相关。

**关键词:** 丹酚酸 A; 氧糖剥夺/复氧; 细胞凋亡; 氧化应激

doi:10.11669/epj.2024.10.007 中图分类号:R966 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)10-0904-07

## The Effect and Mechanism of Salvianolic Acid A on OGD/R-Induced Apoptosis and Oxidative Stress Damage in Cerebral Microvascular Endothelial Cells

SHANG Yufu, LIU Man, LIU Dongni, ZHANG Wenfang, FENG Danhong, XU Shuang, FENG Wandi, DU Guanhua\*, WANG Yuehua\* (Beijing Key Laboratory of Drug Target Identification and Drug Screening, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the protective effect and mechanism of salvianolic acid A (SAL-A) on mouse brain microvascular endothelial (b. End. 3) cell apoptosis and oxidative stress injury after oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R). **METHODS** OGD/R injury was established with b. End. 3 cells for injury model. Cell apoptosis was detected by Annexin V-fluorescein isothiocyanate (Annexin V-FITC) probe and propidium iodide (PI) staining; Reactive oxygen species (ROS) generation was detected by 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) probe; Mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 staining. The expression of proteins related to apoptosis, oxidative stress, and Akt/GSK3 $\beta$ /Nrf2 pathway was detected by Western Blot. **RESULTS** Compared with the control group, the expression of anti-apoptotic proteins, mitochondrial membrane potential, expression of related antioxidant proteins and Akt/GSK3 $\beta$ /Nrf2 pathway were significantly decreased in the OGD/R group ( $P < 0.05$ ). In addition, the number of apoptotic cells, the expression of apoptosis-inducing proteins, and the production of intracellular ROS were significantly increased in the OGD/R group ( $P < 0.05$ ). Whereas, the SAL-A treatment can improve OGD/R-induced cell apoptosis and oxidative stress, the expression of Akt/GSK3 $\beta$ /Nrf2 pathway were significantly increased in the SAL-A-10 group. **CONCLUSION** SAL-A inhibited OGD/R-induced apoptosis and oxidative stress injury in b. End. 3 cells, and the mechanism may be related with affecting the Akt/GSK3 $\beta$ /Nrf2 pathway.

**KEY WORDS:** salvianolic acid A; oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R); apoptosis; oxidative stress

**基金项目:**北京市自然科学基金面上项目资助(7232299);国家自然科学基金专项资助(82141204);中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目资助(2021-I2M-1-069)

**作者简介:**尚宇夫,男,硕士研究生 研究方向:神经药理 \* **通讯作者:**杜冠华,男,博士,研究员,博士生导师 研究方向:新药发现及评价 Tel:(010)63165184;王月华,女,博士,研究员,博士生导师 研究方向:新药发现及成药性评价 Tel:(010)63165313

脑卒中是以内皮受损和血栓形成为病理基础的脑血管疾病<sup>[1]</sup>。脑卒中又可分为出血性脑卒中和缺血性脑卒中<sup>[2]</sup>。脑缺血再灌注(cerebral ischemia-reperfusion, CIR)损伤是指缺血性脑卒中发生后,血流供应重新恢复而导致脑组织损伤进一步加重<sup>[3]</sup>。CIR的病理损伤机制十分复杂,包括钙超载引起的线粒体功能损伤、细胞凋亡、炎症、氧化应激等<sup>[4-5]</sup>。脑微血管内皮细胞是维持血管正常生理功能的基础,其分泌多种活性物质对脑血管进行调节<sup>[6]</sup>,因此,基于内皮细胞凋亡和氧化应激研发药物对降低CIR的致死率尤为重要。核转录因子E2相关因子(nuclear factor erythroid 2 related factor 2, Nrf2)为核心的相关信号通路是调节细胞凋亡和氧化应激损伤的重要信号通路<sup>[7]</sup>。研究表明,蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)在细胞存活和凋亡中起重要作用,可调节细胞内糖原合成酶激酶-3 $\beta$ (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK3 $\beta$ )的磷酸化水平,进而影响Nrf2的水平及其入核后所诱导的一系列下游蛋白的表达<sup>[8]</sup>。细胞质中的kelch样蛋白1(kelch-like protein 1, Keap1)是Nrf2的锚定因子<sup>[9]</sup>。当Nrf2与Keap1分离并进入细胞核后,会调控许多抗氧化蛋白的转录,如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、血红素加氧酶1(heme oxygenase 1, HO-1)等<sup>[10]</sup>。

丹酚酸A(salvianolic acid A, SAL-A)是来自天然药用植物丹参根部的可溶性酚类化合物<sup>[11]</sup>。已有研究证实,SAL-A对早期动脉粥样硬化、弥散性血管内凝血和CIR等多种病理损伤具有药理活性<sup>[12-14]</sup>。然而,SAL-A对脑微血管内皮细胞凋亡与氧化应激的保护作用未见报道。为此,在本研究中通过建立糖氧剥夺/复氧(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)模型模拟CIR损伤,探究SAL-A是否可以抑制OGD/R诱导的脑微血管细胞凋亡与氧化应激损伤及其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

SAL-A(纯度>99%,中国医学科学院协和医院药物研究所);膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素细胞凋亡检测试剂盒(Annexin V-FITC,货号:C1062L)、活性氧检测试剂盒(货号:S0033S)、JC-1染色法线粒体膜电位检测试剂盒(货号:C2003S)(上海碧云天生物技术有限公司);磷酸酶抑制剂(货号:P1260-

1)、蛋白酶抑制剂(货号:P1265-1)、RIPA裂解液(货号:C1053)、5 $\times$ 上样缓冲液(货号:B1007-5)(北京普利莱基因技术有限公司);兔源半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(cysteine specific proteinase 3, Caspase 3)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸醌脱氢酶1(NADPH quinone oxidoreductase 1, NQO1)、HO-1、Keap1一抗(稀释比均为1:1 000,货号:19677-1-AP, 11451-1-AP, 10701-1-AP, 10503-2-AP,英国Proteintech公司);兔源B淋巴细胞瘤2相关X蛋白(B-cell lymphoma-2 associated X protein, Bax)、p-Akt、Akt、p-GSK3 $\beta$ 、GSK3 $\beta$ 、Nrf2、SOD1、SOD2一抗(稀释比均为1:1 000,货号:2772、4060、4685、5558、9315、12721、37385、13141)、鼠源B淋巴细胞瘤2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)一抗(稀释比均为1:1 000,货号:15071, 3700)(美国CST公司);山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗(稀释比均为1:5 000,货号:CW0102, CW0103,康为世纪生物科技股份有限公司);细胞培养箱(MCO-175,美国Sanyo公司);低氧培养箱(8000WJ/IR/N2型,美国Thermo Scientific公司);酶标仪(SpectraMax M5,美国Molecular Device公司);荧光显微镜(日本Nikon公司)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养及处理** 小鼠脑微血管内皮细胞(b. End. 3细胞)购于中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心,在含质量分数10%胎牛血清的高糖DMEM培养基中于37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养。细胞处理分组:正常对照组(Control),糖氧剥夺/复氧组(OGD/R)、SAL-A 0.1  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>组(SAL-A-0.1)、SAL-A 1  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>组(SAL-A-1)和SAL-A 10  $\mu$ mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>组(SAL-A-10)。将b. End. 3细胞接种于96孔板(每孔5 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞)或6孔板中(每孔5 $\times$ 10<sup>5</sup>个细胞),细胞贴壁达到70%融合后,OGD/R组及给药组细胞更换为无糖DMEM培养基并转移到1% O<sub>2</sub>低氧培养箱中培养12 h,然后再更换为高糖DMEM培养基,给药组加入不同浓度的SAL-A, OGD/R组加入溶剂对照, OGD/R组及给药组转移至常规培养箱继续培养8 h。Control组细胞始终使用高糖DMEM培养基并在常规培养箱培养。

**1.2.2 Annexin V、PI染色法检测细胞凋亡** 细胞处理结束后去除培养孔内培养基,按照试剂盒说明书加入Annexin V、碘化丙啶(PI)染色试剂,微量震荡器上震荡混匀30 s,室温避光孵育25 min,荧光显

显微镜观察各组细胞染色情况并拍照, Image J 软件按公式 1 计算相对荧光强度。

相对荧光强度 = 模型或给药组荧光强度 / 对照组荧光强度 公式(1)

**1.2.3** 荧光探针法检测细胞活性氧(ROS)生成 细胞处理结束后去除培养孔内培养基,按照试剂盒说明加入 ROS 检测试剂,荧光显微镜观察染色情况并拍照,利用 Image J 软件计算相对荧光强度。

**1.2.4** JC-1 染色法检测线粒体膜电位 细胞处理结束后去除培养孔内培养基,按照试剂盒说明加入 JC-1 染色试剂,37 °C 避光孵育 20 min。孵育结束后用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次,荧光显微镜观察染色情况并拍照, Image J 软件计算相对荧光强度。

**1.2.5** 免疫印迹法检测蛋白表达 细胞处理结束后去除培养孔内培养基,收集细胞,加入预冷 RIPA 裂解液(含蛋白酶抑制剂混合物)裂解 30 min,于 4 °C, 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 15 min,取上清液蛋白定量(BCA)法定蛋白浓度。通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白样品,室温条件下以恒定 400 mA 电流转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,5%牛血清蛋白于 4 °C 过夜封闭,封闭结束后 4 °C 孵育相应一抗 18 h。Tris-HCl 缓冲盐溶液 + 聚山梨酯(TBST)漂洗 5 次后加入相应的二抗溶液在室温下孵育 2 h, TBST 缓冲液漂洗 5 次,加入超敏型 ECL 检测液显影,使用 Image J 软件,以  $\beta$ -actin 为内参对待测蛋白条带进行灰度值处理<sup>[15]</sup>。

### 1.3 统计学分析

利用 GraphPad Prism 7 软件进行绘图以及统计学分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析进行组间比较, $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SAL-A 对 OGD/R 诱导 b. End. 3 细胞凋亡的影响

与 Control 组比较, OGD/R 组凋亡细胞数量显著增加,而 SAL-A-1、SAL-A-10 组显著改善 OGD/R 诱导的细胞凋亡( $P < 0.05$ , 图 1A)。

与 Control 组比较, OGD/R 组 Cleaved-Caspase3/Caspase3 及 Bax 表达显著增加( $P < 0.05$ ), Bcl-2 表达显著降低( $P < 0.05$ )。与 OGD/R 组比较, SAL-A-0.1, SAL-A-1, SAL-A-10 组均可显著降低凋亡相关蛋白 Cleaved-Caspase3/Caspase3 水平( $P < 0.05$ , 图 1B),

SAL-A-10 组显著改善 Bax 及 Bcl-2 的异常表达( $P < 0.05$ , 图 1B)。

### 2.2 SAL-A 对 OGD/R 诱导 b. End. 3 细胞 ROS 产生及线粒体膜电位的影响

与 Control 组比较, OGD/R 组细胞内 ROS 的产生显著增加( $P < 0.05$ ), 而 SAL-A-0.1, SAL-A-1, SAL-A-10 组均可显著改善 OGD/R 后细胞内 ROS 的增高( $P < 0.05$ , 图 2A)。

与 Control 组比较, OGD/R 组细胞线粒体的膜电位显著降低( $P < 0.05$ ), 而 SAL-A-1 和 SAL-A-10 组可显著改善 OGD/R 后细胞线粒体膜电位降低( $P < 0.05$ , 图 2B)。

### 2.3 SAL-A 对 OGD/R 诱导 b. End. 3 细胞抗氧化蛋白表达的影响

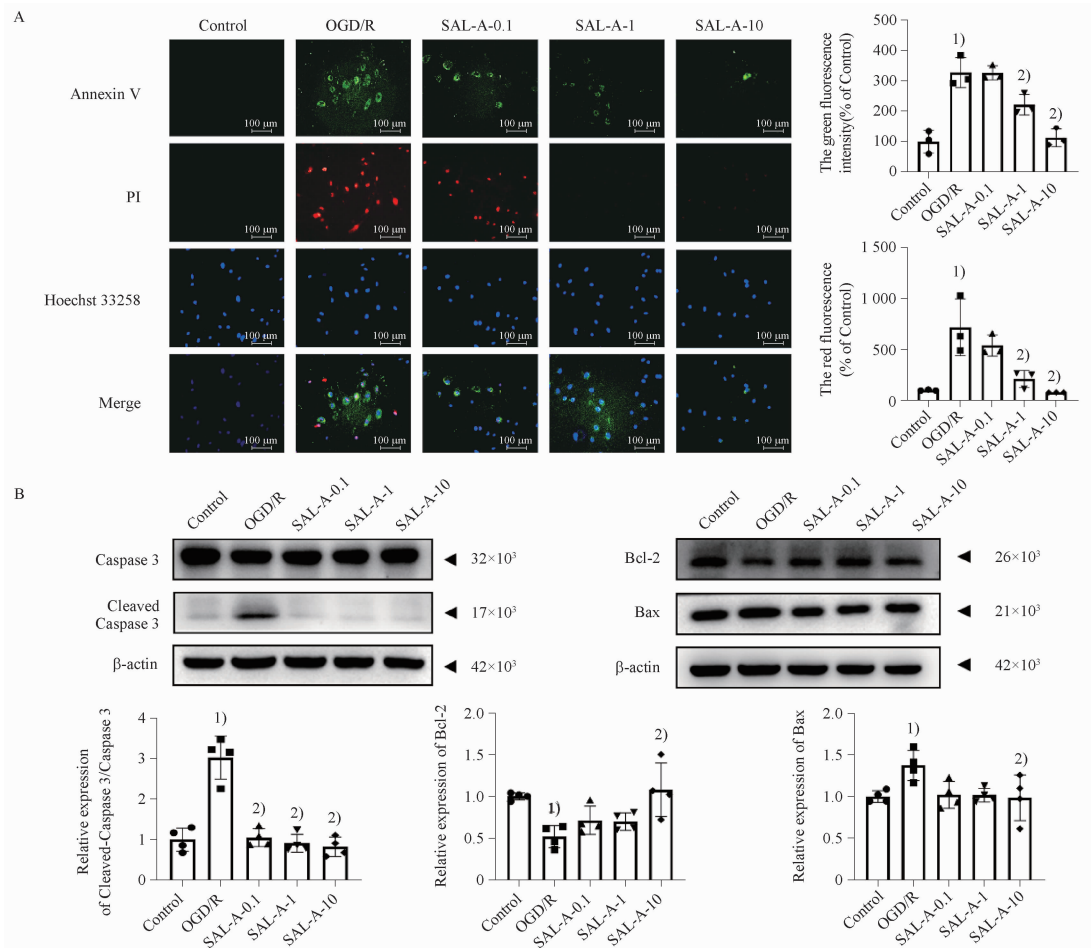
与 Control 组比较, OGD/R 组细胞 NQO1、SOD1 和 SOD2 的蛋白表达水平均显著减少( $P < 0.05$ ), 而 HO-1 蛋白表达水平显著增加( $P < 0.05$ )。与 OGD/R 组比较, SAL-A-0.1, SAL-A-1, SAL-A-10 组均可显著增加 NQO1 蛋白表达, SAL-A-10 组显著增加 SOD1 和 SOD2 的蛋白表达水平( $P < 0.05$ ), SAL-A-1, SAL-A-10 组显著降低 HO-1 蛋白表达水平( $P < 0.05$ )。结果见图 3。

### 2.4 SAL-A 对 OGD/R 诱导 b. End. 3 细胞 Akt/GSK3 $\beta$ /Nrf2 通路的影响

与 Control 组比较, OGD/R 组细胞 Akt 蛋白磷酸化、GSK3 $\beta$  蛋白磷酸化、Nrf2 蛋白表达水平显著下降( $P < 0.05$ ), 而 Keap1 的蛋白表达水平显著上升( $P < 0.05$ )。与 OGD/R 组比较, SAL-A-10 组 Akt 蛋白磷酸化、GSK3 $\beta$  蛋白磷酸化、Nrf2 蛋白表达水平显著增加( $P < 0.05$ ), SAL-A-0.1, SAL-A-1, SAL-A-10 组均可显著降低 Keap1 蛋白表达水平( $P < 0.05$ )。结果见图 4。

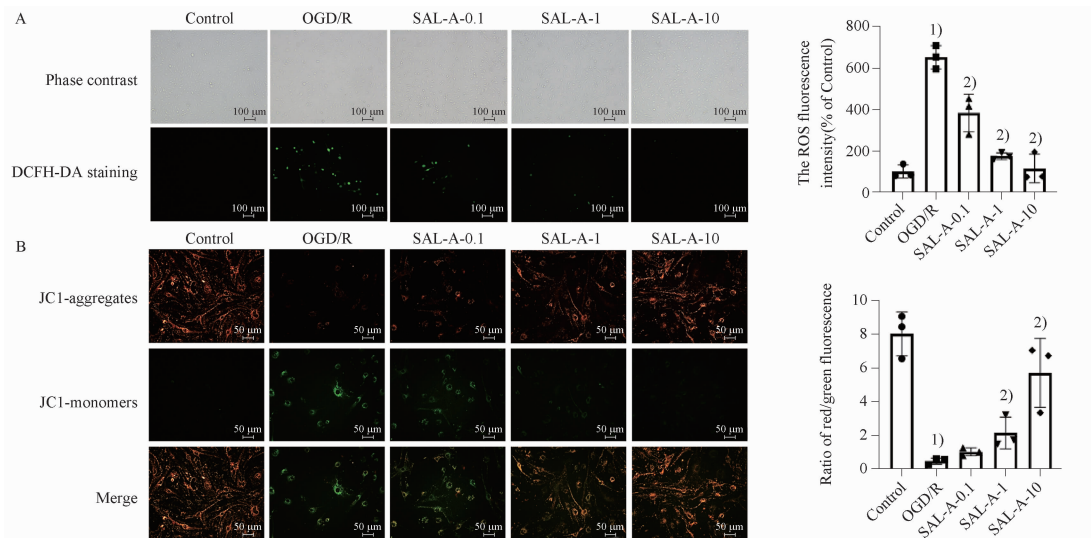
## 3 讨论

CIR 诱导的病理损伤机制极为复杂,神经兴奋性毒性、细胞程序性死亡、神经炎症以及氧化应激等多种病理损伤机制都与 CIR 相关<sup>[16]</sup>。在大脑缺血期间,由于缺乏必要的葡萄糖和氧气的供应,脑组织细胞会因能量耗竭而死亡,死亡的神经细胞会释放胞内溶质继而引起免疫细胞的吞噬以及大量趋化因子和炎症因子的释放,最终引起脑部不可逆损伤<sup>[17]</sup>。目前,溶栓疗法主要用于脑缺血的治疗,但溶栓后血液的再灌注可能引发继发性脑损伤,从而造成患者认知障碍的进一步加重,甚至导致终身



A - 膜联蛋白 V、碘化丙啶染色检测细胞凋亡(标尺 = 100 μm); B - 凋亡相关蛋白表达; 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; 与 OGD/R 组相比, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。  
A - Annexin V, PI staining to detect apoptosis(scale = 100 μm); B - apoptosis-related protein expression; <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , *vs* control group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , *vs* OGD/R group.

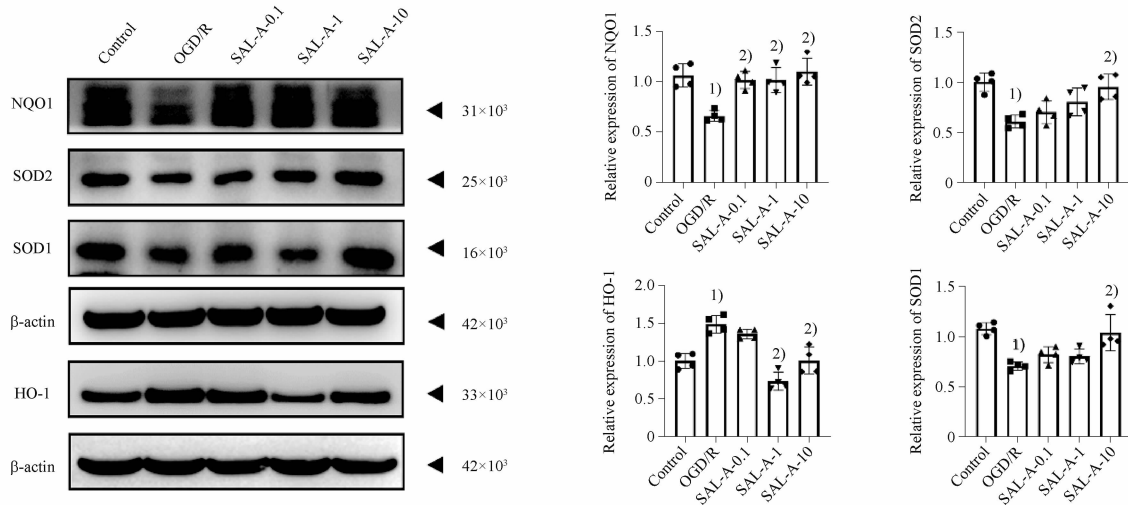
**图 1** 丹酚酸 A(SAL-A)对氧糖剥夺/复氧(OGD/R)诱导小鼠脑微血管内皮细胞(b. End. 3)凋亡的影响。  $n = 3, \bar{x} \pm s$   
**Fig. 1** Effects of SAL-A on apoptosis induced by OGD/R in b. End. 3 cells.  $n = 3, \bar{x} \pm s$



A - 荧光探针检测细胞内 ROS 生成(标尺 = 100 μm); B - JC-1 法检测细胞线粒体膜电位(标尺 = 50 μm); 与对照组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; 与 OGD/R 组相比, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。  
A - fluorescent probe for ROS production(scale = 100 μm); B - JC-1 staining for mitochondrial membrane potential(scale = 50 μm); <sup>1)</sup> $P < 0.05$ , *vs* control group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , *vs* OGD/R group.

**图 2** SAL-A 对 OGD/R 诱导 b. End. 3 细胞活性氧(ROS)产生及线粒体膜电位的影响。  $n = 3, \bar{x} \pm s$

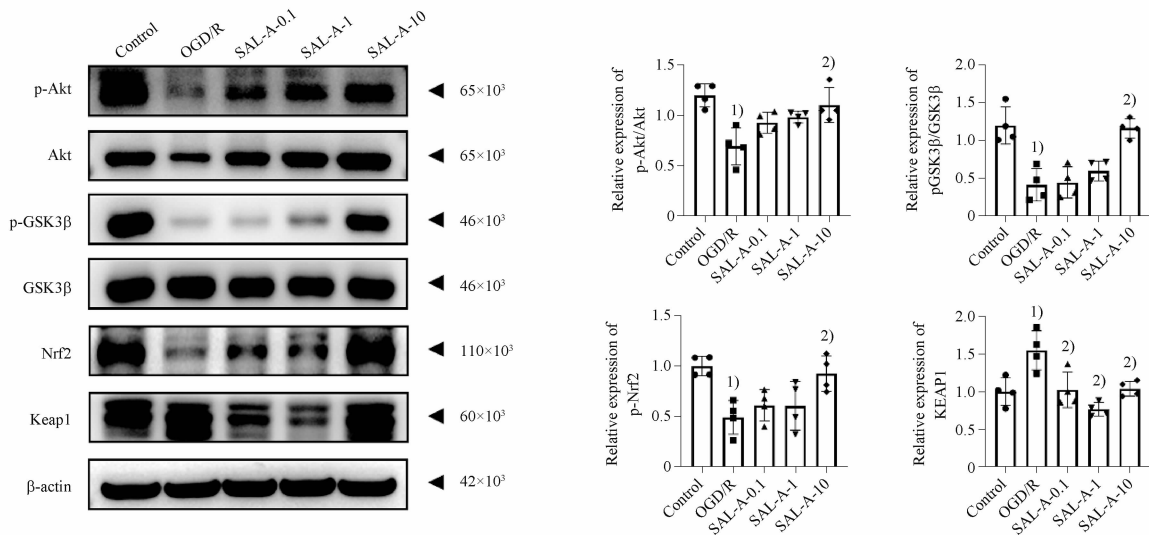
**Fig. 2** Effects of SAL-A on ROS production and mitochondrial membrane potential induced by OGD/R in b. End. 3 cells.  $n = 3, \bar{x} \pm s$



与对照组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; 与 OGD/R 组相比, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。  
<sup>1)</sup> $P < 0.05$ , vs control group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , vs OGD/R group.

**图 3** SAL-A 对 OGD/R 诱导 b. End. 3 细胞抗氧化酶的影响.  $n = 4, \bar{x} \pm s$

**Fig. 3** Effects of SAL-A on antioxidant enzymes induced by OGD/R in b. End. 3 cells.  $n = 4, \bar{x} \pm s$



与对照组相比, <sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; 与 OGD/R 组相比, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。  
<sup>1)</sup> $P < 0.05$ , vs control group; <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , vs OGD/R group.

**图 4** SAL-A 对 OGD/R 诱导 b. End. 3 细胞 Akt/GSK3β/Nrf2 通路的影响.  $n = 4, \bar{x} \pm s$

**Fig. 4** Effects of SAL-A on Akt/GSK3β/Nrf2 pathway induced by OGD/R in b. End. 3 cells.  $n = 4, \bar{x} \pm s$

残疾<sup>[18]</sup>。因此寻找开发针对 CIR 损伤的药物具有重要意义。本研究应用脑微血管内皮细胞 OGD/R 损伤模型模拟体内 CIR 损伤,探讨 SAL-A 对 OGD/R 诱导的 b. End. 3 细胞凋亡及氧化损伤的作用及机制,为 SAL-A 治疗缺血性脑卒中提供实验依据。

细胞凋亡是细胞程序性死亡的方式之一,同时也是 CIR 发生后常见的细胞死亡诱导因素。凋亡信号的产生可能由细胞内或者细胞外途径介导,细胞内途径起始于线粒体功能损伤,细胞外途径则受

锚定在细胞表面的相关受体影响<sup>[19-20]</sup>,上述两种途径均可激活相应的小分子蛋白如 Caspase 家族蛋白,从而引起细胞凋亡<sup>[21]</sup>。Bax 和 Bcl-2 之间存在复杂的相互作用关系,在正常状态下,二者可以相互结合,从而维持细胞的正常状态,而当 Bax 在细胞内表达增多时则会促进细胞凋亡<sup>[22]</sup>。Annexin V 是一种磷脂结合蛋白,其在细胞内发挥作用需要依赖钙离子,在细胞发生凋亡的早期,Annexin V 可以选择性结合外翻到细胞表面的磷脂酰丝氨酸<sup>[23]</sup>。本研

究结果表明, SAL-A 可显著降低 OGD/R 诱导的凋亡细胞数量, 抑制 Bax 蛋白的表达, 促进 Bcl-2 蛋白的表达。

在氧化应激作用下, 许多细胞(如血管内皮细胞)会产生一系列应激反应, 这种应激过程及其引发的一系列连锁反应与 CIR 所引发病理损伤的关联性不容忽视<sup>[24]</sup>。氧化应激产生与许多酶联反应系统相关, 常见的酶联反应系统包括黄嘌呤氧化酶系统、还原型辅酶 II 氧化酶系统、线粒体电子传递链系统等<sup>[25]</sup>。此外, 血红蛋白和肌红蛋白可以通过另一种方式引起氧化应激<sup>[26]</sup>。氧化应激产生的 ROS 作为高活性、不稳定分子可以通过多种代谢途径, 如细胞呼吸、蛋白质代谢等对细胞造成一系列的损伤<sup>[27]</sup>。线粒体功能障碍是 CIR 诱导病理损伤的重要原因, 也是氧化应激过程中的关键触发因素之一。线粒体膜电位的减少是线粒体功能障碍的标志性指标<sup>[28]</sup>。本研究结果表明, SAL-A 可以显著抑制 OGD/R 诱导的 ROS 产生, 抑制线粒体膜电位的下降, 从而通过抑制氧化应激保护脑微血管内皮细胞。

体内对氧化应激引起的一系列损伤有相应的调节与抵抗系统, 这其中就包括抗氧化酶系统, 包括 SOD、NQO1 等<sup>[29]</sup>。SOD 可催化超氧阴离子自由基歧化为过氧化氢和氧气<sup>[30]</sup>。同样, NQO1 作为一种同源二聚体黄嘌呤酶, 可由多环芳烃、氢醌诱导, 催化双电子还原反应使醌类转换为对细胞无害的物质, 并抑制谷胱甘肽的耗竭<sup>[31]</sup>。因此, 细胞内 NQO1 和 SOD 的水平可间接显示细胞的抗氧化应激能力。本研究结果表明, SAL-A 可以显著增加 OGD/R 后细胞内 NQO1 和 SOD1 和 SOD2 的表达, 从而抵抗 OGD/R 所造成的氧化应激, 发挥保护细胞作用。

Akt/GSK3 $\beta$ /Nrf2 是细胞中重要且广泛存在的一种可以抵抗氧化应激的分子通路<sup>[32]</sup>。有研究表明, 活化(磷酸化)的 Akt 可使 GSK3 $\beta$  失活(磷酸化), 失活的 GSK3 $\beta$  可减少酪氨酸激酶的磷酸化, 进而激活 Nrf2 并阻止 Nrf2 向细胞质输出和降解<sup>[33]</sup>。Nrf2 被激活后, 通过与 Keap1 分离来抵抗其诱导的泛素-蛋白酶体降解, 并进行相关核转位<sup>[34]</sup>。进入细胞核后, Nrf2 可以增加 SOD1、SOD2 和 NQO1 的表达, 从而发挥抗氧化作用<sup>[35-36]</sup>。本研究结果表明, SAL-A 可以显著增加 Akt 和 GSK3 $\beta$  的磷酸化与 Nrf2 的表达, 这提示 SAL-A 可能通过影响此通路来减轻 OGD/R 诱导的细胞凋亡与氧化应激。

综上所述, SAL-A 能够抑制 OGD/R 诱导的脑微血管内皮细胞凋亡和氧化应激损伤, 增加抗凋亡

蛋白与抗氧化蛋白的表达, 作用机制与调控 Akt/GSK3 $\beta$ /Nrf2 通路相关。

## REFERENCES

- [1] FESKE S K. Ischemic stroke[J]. *Am J Med*, 2021, 134(12): 1457-1464.
- [2] FEIGIN V L, BRAININ M, NORRVING B, et al. World Stroke Organization (WSO): global stroke fact sheet 2022[J]. *Int J Stroke*, 2022, 17(1): 18-29.
- [3] WU M Y, YANG G T, LIAO W T, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(4): 1650-1667.
- [4] ZHANG Q, JIA M, WANG Y, et al. Cell death mechanisms in cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Neurochem Res*, 2022, 47(12): 3525-3542.
- [5] JURCAU A, SIMION A. Neuroinflammation in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injuries: from pathophysiology to therapeutic strategies[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 14. DOI: 10.3390/ijms23010014
- [6] PHOENIX A, CHANDRAN R, ERGUL A. Cerebral microvascular senescence and inflammation in diabetes[J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 864758. DOI: 10.3389/fphys.2022.864758
- [7] MA Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013, 53: 401-426.
- [8] LIAO S, WU J, LIU R, et al. A novel compound DBZ ameliorates neuroinflammation in LPS-stimulated microglia and ischemic stroke rats: role of Akt(Ser473)/GSK3 $\beta$ (Ser9)-mediated Nrf2 activation[J]. *Redox Biol*, 2020, 36: 101644. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101644.
- [9] BELLEZZA I, GIAMBANCO I, MINELLI A, et al. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2018, 1865(5): 721-733.
- [10] ZHANG Q, LIU J, DUAN H, et al. Activation of Nrf2/HO-1 signaling: an important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress[J]. *J Adv Res*, 2021, 34: 43-63.
- [11] QIN T, RASUL A, SARFRAZ A, et al. Salvianolic acid A & B: potential cytotoxic polyphenols in battle against cancer via targeting multiple signaling pathways[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(10): 2256-2264.
- [12] ZHANG Q Y, GUO J, XU L, et al. Salvianolic acid A alleviates lipopolysaccharide-induced disseminated intravascular coagulation by inhibiting complement activation[J]. *BMC Complement Med Ther*, 2022, 22(1): 245. DOI: 10.1186/s12906-022-03720-z.
- [13] MA Q, YANG Q, CHEN J, et al. Salvianolic acid A ameliorates early-stage atherosclerosis development by inhibiting NLRP3 inflammasome activation in Zucker diabetic fatty rats[J]. *Molecules*, 2020, 25(5): 1089. DOI: 10.3390/molecules25051089
- [14] ZHANG W, SONG J K, YAN R, et al. Salvianolic acid A attenuates cerebral ischaemia-reperfusion injury in rats via the Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51(11): 1717-1723.
- [15] LIU M, ZHANG S S, LIU D N, et al. Effect and possible mechanism of elaiophyllin HY1 against LPS induced neuroinflammation[J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2021, 56(15): 1215-1219.
- [16] WU T, YIN F, KONG H, et al. Germacrone attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats via antioxidative and antiapoptotic mechanisms[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(11): 18901-18909.

- [17] SAINI V, GUADA L, YAVAGAL D R. Global epidemiology of stroke and access to acute ischemic stroke interventions[J]. *Neurology*, 2021, 97(20):6-16.
- [18] PRZYKAZA Ł. Understanding the connection between common stroke comorbidities, their associated inflammation, and the course of the cerebral ischemia/reperfusion cascade[J]. *Front Immunol*, 2021, 12:782569. DOI:10.3389/fimmu.2021.782569.
- [19] KHOSHNAM S E, WINLOW W, FARZANEH M, *et al.* Pathogenic mechanisms following ischemic stroke[J]. *Neurol Sci*, 2017, 38(7):1167-1186.
- [20] PISTRITTO G, TRISCIUOGLIO D, CECI C, *et al.* Apoptosis as anticancer mechanism; function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies[J]. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8(4):603-619.
- [21] FAN T J, HAN L H, CONG R S, *et al.* Caspase family proteases and apoptosis[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2005, 37(11):719-727.
- [22] LI R, ZHANG W, SONG J K, *et al.* Injectable salvia divinorum polyphenolic acid attenuates OGD/R-induced PC12 cell injury via PI3K/Akt and JAK2/STAT3 signalling pathways[J]. *Chin Pharm J (中国药理学杂志)*, 2023, 58(5):419-425.
- [23] NIU G, CHEN X. Apoptosis imaging: beyond annexin V[J]. *J Nucl Med*, 2010, 51(11):1659-1662.
- [24] WANG Y, HONG F, YANG S. Roles of nitric oxide in brain ischemia and reperfusion[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(8):4243. DOI:10.3390/ijms23084243.
- [25] VITALE G, SALVIOLI S, FRANCESCHI C. Oxidative stress and the ageing endocrine system[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2013, 9(4):228-240.
- [26] GRANGER D N, KVIETYS P R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: the evolution of a concept[J]. *Redox Biol*, 2015, 6:524-551.
- [27] ORELLANA-URZ ÚA S, ROJAS I, LÍBANO L, *et al.* Pathophysiology of ischemic Stroke; role of oxidative stress[J]. *Curr Pharm Des*, 2020, 26(34):4246-4260.
- [28] KALPAGE H A, BAZYLIANSKA V, RECANATI M A, *et al.* Tissue-specific regulation of cytochrome c by post-translational modifications: respiration, the mitochondrial membrane potential, ROS, and apoptosis[J]. *FASEB J*, 2019, 33(2):1540-1553.
- [29] HAO M, LIU R. Molecular mechanism of CAT and SOD activity change under MPA-CdTe quantum dots induced oxidative stress in the mouse primary hepatocytes[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2019, 220:117104. DOI:10.1016/j.saa.2019.05.009.
- [30] MIZUGUCHI S, CAPRETTA A, SUEHIRO S, *et al.* Carbon monoxide-releasing molecule CORM-3 suppresses vascular endothelial cell SOD-1/SOD-2 activity while up-regulating the cell surface levels of SOD-3 in a heparin-dependent manner[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(10):1534-1541.
- [31] ROSS D, SIEGEL D. The diverse functionality of NQO1 and its roles in redox control[J]. *Redox Biol*, 2021, 41:101950. DOI:10.1016/j.redox.2021.101950.
- [32] RONG H, LIANG Y, NIU Y. Rosmarinic acid attenuates  $\beta$ -amyloid-induced oxidative stress via Akt/GSK-3 $\beta$ /Fyn-mediated Nrf2 activation in PC12 cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 120:114-123.
- [33] YU H, ZHEN J, YANG Y, *et al.* Rg1 protects H9C2 cells from high glucose/palmitate-induced injury via activation of AKT/GSK-3 $\beta$ /Nrf2 pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(14):8194-8205.
- [34] CHEN Q M. Nrf2 for protection against oxidant generation and mitochondrial damage in cardiac injury[J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 179:133-143.
- [35] ZHANG Z, FU C, LIU J, *et al.* Hypermethylation of the Nrf2 promoter induces ferroptosis by inhibiting the Nrf2-GPX4 axis in COPD[J]. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2021, 16:3347-3362.
- [36] WANG K, LV Q, MIAO Y M, *et al.* Cardamonin, a natural flavone, alleviates inflammatory bowel disease by the inhibition of NLRP3 inflammasome activation via an AhR/Nrf2/NQO1 pathway[J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 155:494-509.

(收稿日期:2023-12-29)