黄芩素对缺氧致大鼠皮质神经元细胞损伤的保护作用及机制Δ

张冬梅*，张　洁，石志群，张朋朋，谭宏强，马慧萍#（联勤保障部队第九四〇医院药剂科/全军高原医学实验室，兰州　730050）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）12-1431-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.12.05

摘　要　目的　探讨黄芩素对缺氧致大鼠皮质神经元细胞损伤的保护作用及可能机制。**方法**　以大鼠皮质神经元RN-C细胞为研究对象，以缺氧条件（5%CO_2、94%N_2、1%O_2）培养24 h，考察不同浓度黄芩素（0.01、0.1、1、10、100 μmol/L）对缺氧RN-C细胞存活率的影响，并检测黄芩素（浓度为0.1 μmol/L）对缺氧细胞的乳酸脱氢酶（LDH）、超氧化物歧化酶（SOD）活性和丙二醛（MDA）含量，细胞迁移率、凋亡率和细胞周期，以及对缺氧细胞中活化的胱天蛋白酶3（cleaved caspase-3）、B细胞淋巴瘤2（Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bax）表达的影响。**结果**　与对照组比较，缺氧组细胞的存活率显著降低（$P<0.01$）；0.01、0.1、1 μmol/L黄芩素可以逆转缺氧导致的细胞存活率降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。划痕实验显示，黄芩素可显著升高缺氧RN-C细胞的迁移率（$P<0.01$）。与对照组比较，缺氧组细胞上清液中LDH活性、细胞中MDA含量、凋亡率和G1期细胞比例显著增加，SOD活性、G2+S期细胞比例显著降低（$P<0.01$）；细胞中cleaved caspase-3蛋白的表达量显著上升，Bcl-2/Bax比值均显著下降（$P<0.05$或$P<0.01$）。与缺氧组比较，黄芩素组细胞显著逆转了上述指标（$P<0.01$）。**结论**　黄芩素能促进缺氧条件下大鼠皮质神经元细胞的增殖和迁移，改善缺氧诱导的细胞凋亡和细胞周期阻滞，降低上清液中LDH活性，降低细胞脂质过氧化水平，提高抗氧化水平；其机制可能与调控caspase-3/Bax/Bcl-2通路有关。

关键词　黄芩素；大鼠皮质神经元细胞；缺氧；神经保护；caspase-3/Bax/Bcl-2

Protective effect and mechanism of baicalein on hypoxia-induced cortical neuron injury in rats

ZHANG Dongmei, ZHANG Jie, SHI Zhiqun, ZHANG Pengpeng, TAN Hongqiang, MA Huiping (Dept. of Pharmacy, the 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of PLA/Lab of PLA for High Altitude Medicine, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To explore the protective effect and possible mechanism of baicalein on hypoxia-induced cortical neuron injury in rats. **METHODS** The cortical neurons of rats (RN-C cells) were studied and cultured under hypoxic conditions (5%CO_2, 94% N_2, 1%O_2) for 24 hours; the effects of different concentrations of baicalein (0.01, 0.1, 1, 10, 100 μmol/L) on the survival rate of hypoxic RN-C cells were investigated; the effects of baicalein (0.1 μmol/L) on the activities of lactate dehydrogenase (LDH) and superoxide dismutase (SOD), the content of malondialdehyde (MDA), migration rate, apoptotic rate, cell cycle and the expressions of cleaved caspase-3, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 X protein (Bax) were all detected. **RESULTS** Compared with control group, the survival rate of cells in the hypoxia group was significantly reduced ($P<0.01$); 0.01, 0.1 and 1 μmol/L baicalein could reverse survival rate of hypoxia-induced cortical neurons ($P<0.05$ or $P<0.01$). Scratch experiments showed that baicalein significantly increased the migration rate of hypoxic RN-C cells ($P<0.01$). Compared with control group, the activity of LDH in the supernatant and the content of MDA in the cells, apoptotic rate and the proportion of cells in G1 phase, were significantly increased in the hypoxia group, while SOD activity and the proportion of cells in G2+S phase was decreased significantly ($P<0.01$). The protein expressions of cleaved caspase-3 were increased significantly, while the ratio of Bcl-2/Bax in cells was significantly reduced ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with hypoxia group, the above indexes were all reversed significantly in baicalein group ($P<0.01$). **CONCLUSIONS** Baicalein can promote the proliferation and migration of cortical neurons, improve hypoxia-induced cell apoptosis and cell cycle distribution, decrease the activity of LDH in supernatant and the level of cellular lipid peroxidation, and improve antioxidant levels. Its mechanism may be related to regulating the caspase-3/Bax/Bcl-2 pathway.

KEYWORDS　baicalein; cortical neuron of rats; hypoxia; neuroprotection; caspase-3/Bax/Bcl-2

大脑是机体对缺氧最敏感的器官，缺氧可引起神经元等许多其他细胞的损伤，导致机体学习记忆能力降低、智力发育迟缓等，因此减少缺氧引起的脑组织细胞

Δ**基金项目**　甘肃省科技计划项目（No.22JR11RA014）；甘肃省卫生健康行业科研项目（No.GSWSKY2022-46）；第九四〇医院院内科研项目（No.2021yxky046，No.2022yxky004）

＊**第一作者**　主管药师，硕士。研究方向：高原缺氧损伤分子机制。E-mail：835935150@qq.com

＃**通信作者**　主任药师，教授，硕士生导师。研究方向：高原缺氧损伤机制及新药研发。E-mail：1026573411@qq.com

损伤对缺氧相关疾病的防治具有重要意义[1-3]。过去从天然药物中分离出的多种化合物被证实可以改善缺氧，如黄酮类化合物、生物碱多酚、皂苷、萜类和挥发油类化合物等[4]。其中，黄芩素是黄芩属植物中丰富的黄酮类化合物之一，能通过有抗氧化应激、抗炎症反应、抗神经细胞兴奋性毒性及抑制神经细胞凋亡和自噬等多种机制发挥神经细胞保护作用[5]，对神经退行性病变及其他中枢神经系统疾病均表现出较明显的预防和治疗作用，但是对于缺氧诱导的神经细胞损伤是否具有保护作用尚不清楚。

凋亡是一种由基因精确调控的程序性细胞死亡方式，过度或不充分的凋亡可能导致多种疾病的发生。研究证实，缺氧可激活凋亡通路引起细胞损伤[6]，其中B细胞淋巴瘤2相关X蛋白（B-cell lymphoma-2 X protein，Bax）是促凋亡蛋白，其与抗凋亡蛋白B细胞淋巴瘤2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）以二聚体的形式存在于细胞中，二者之间的动态平衡对细胞凋亡的发生起关键作用[7]。胱天蛋白酶3（caspase-3）是凋亡的效应因子，活化的caspase-3（cleaved caspase-3）能分解细胞蛋白，起到凋亡执行器的作用。caspase-3/Bax/Bcl-2通路是细胞凋亡发生发展的重要途径[8]。基于此，本研究拟通过体外实验观察黄芩素对缺氧大鼠皮质神经元细胞的保护作用；并以caspase-3/Bax/Bcl-2细胞凋亡通路为线索，探讨黄芩素的作用机制，以期为抗缺氧药物的研究和应用提供理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括INC153H9T6型三气培养箱（德国Memmert公司）、mic-101型便携式细胞低氧小室（美国Billups-Rothenberg公司）、Spectra Max i3型全自动荧光酶标仪（美国Molecular Devices公司）、ACEA NovoCyte型流式细胞仪（美国ACEA Biosciences公司）、CKX41型倒置相差显微镜（日本Olympus公司）、EST-10-O2型氧浓度测定仪（深圳市兴源恒通科技有限公司）、ChemiDoc MP型凝胶成像分析系统（美国Bio-Rad公司）等。

1.2 主要药品与试剂

黄芩素标准品（批号JPJYH-QJ，纯度＞98.0%）购自日本东京化成工业株式会社；BCA蛋白定量检测试剂盒、兔抗鼠Bax单克隆抗体、鼠β-肌动蛋白（β-actin）单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗（批号分别为GB12690、GB15001、GB25301、G2026）均购自武汉塞维尔生物科技有限公司；DMEM高糖培养基购自美国HyClone公司；胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）、青霉素-链霉素双抗均购自兰杰柯生物科技有限公司；乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）试剂盒（批号分别为20180728、20180728、20190412）均购自南京建成生物工程研究所；CCK-8细胞活力检测试剂盒（批号PM508）购自日本Dojindo公司；DNA含量检测试剂盒（细胞周期）（批号20210105）购自北京索莱宝科技有限公司；FITC标记的Annexin Ⅴ-FITC细胞凋亡检测试剂盒（批号10625-2）购自上海碧云天生物技术公司；兔Bcl-2多克隆抗体（批号bf9103）购自美国Affinity公司；兔cleaved caspase-3多克隆抗体（批号9664s）购自美国Cell Signaling Technology公司。

1.3 细胞

大鼠皮质神经元RN-C细胞，购于上海清奇生物公司。

2 方法

2.1 RN-C细胞培养

将RN-C细胞接种于DMEM高糖培养基（含10%FBS和1%青霉素-链霉素）中，于37 ℃、5%CO_2和95%相对饱和湿度的培养箱中培养。待细胞密度达80%～90%时，用0.25%胰酶消化1～2 min，用培养基终止消化后按1∶3比例传代，待细胞长至对数生长期后进行后续实验。

2.2 分组与处理

将RN-C细胞随机分为对照组、缺氧组和黄芩素组。对照组细胞在正常培养条件下培养24 h；缺氧组细胞在课题组前期实验确定的缺氧条件（即5%CO_2、94%N_2、1%O_2）下培养24 h；黄芩素组细胞加入用培养基稀释的相应浓度的黄芩素培养30 min后，再在上述缺氧条件下培养24 h。

2.3 细胞存活率测定

采用CCK-8法对细胞存活率进行检测。取对数生长期且状态良好的RN-C细胞，用0.25%胰酶消化后，分别按1×10^4个/孔的密度接种于96孔板，随机分为对照组、缺氧组、不同浓度的黄芩素组（100、10、1、0.1、0.01 μmol/L），每组设置6个复孔。于37 ℃、5%CO_2条件下培养24 h后，弃去旧培养基，对照组和缺氧组细胞加入新培养基100 μL，黄芩素组细胞分别加入含黄芩素100、10、1、0.1、0.01 μmol/L的培养基100 μL，同时设置不含细胞、不含药物的培养基为空白组。按“2.2”项下培养方法处理细胞，继续培养24 h后，弃去旧培养基，于避光条

件下每孔加入培养基稀释的CCK-8试剂100 μL，在培养箱中孵育2 h，于450 nm波长处检测各孔的光密度（OD）值，并计算细胞存活率。细胞存活率的计算公式如下：细胞存活率＝（实验组OD值－空白组OD值）/（对照组OD值－空白组OD值）×100%。

2.4 LDH、SOD活性和MDA含量检测

取对数生长期且状态良好的RN-C细胞，调整密度至1×10^6个/mL，按2 mL/孔接种于6孔板中，随机分为对照组、缺氧组、黄芩素组（0.1 μmol/L，根据“2.3”项下筛选的药物浓度结果设置），每组设置6个复孔。按“2.3”项下方法培养24 h，收集细胞和上清液，按照各试剂盒说明书检测各组细胞上清液中LDH的活性，细胞中MDA的含量和SOD的活性。

2.5 细胞迁移率检测

采用划痕实验进行检测。将对数生长期的细胞调整密度至3×10^5个/mL，按2 mL/孔接种至6孔板中。随机分为对照组、缺氧组和黄芩素组，处理方式同“2.4”项下。用无菌枪头在孔底垂直标记划痕线，用PBS清洗2次，拍照记录划痕后0、24 h时的划痕愈合情况；用Image J软件计算划痕面积，并计算细胞迁移率。细胞迁移率的计算公式如下：细胞迁移率（%）＝（S_0-S_{24}）/$S_0\times100\%$，式中，S_0、S_{24}分别指0、24 h时的划痕面积。

2.6 细胞凋亡率和细胞周期检测

2.6.1 细胞凋亡率 采用Annexin Ⅴ-FITC/PI双染流式细胞术检测。取对数生长期的RN-C细胞，以1×10^5个/mL接种于6孔板中，按“2.4”项下方法分组处理、培养24 h，每组设置3个复孔。对细胞进行消化和收集，用PBS洗涤后以1 500 r/min离心5 min，收集各组细胞于离心管中，用400 μL 1×binding buffer重悬制成密度为1×10^6个/mL的细胞悬液；按FITC标记的Annexin Ⅴ-FITC细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作，应用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.6.2 细胞周期 采用流式细胞术进行检测。分组、培养方法同“2.6.1”项下，以1 500 r/min离心5 min，收集各组细胞，用PBS洗涤2次后，将细胞分散于－20 ℃的75%乙醇中固定过夜；以1 500 r/min离心5 min，收集细胞，用PBS洗涤2次后按DNA含量检测试剂盒（细胞周期）说明书进行操作，并应用流式细胞仪检测分析细胞周期的分布情况。

2.7 细胞中cleaved caspase-3、Bcl-2、Bax蛋白表达影响的检测

采用Western blot方法进行检测。取RN-C细胞，按“2.4”项下方法分组、处理、培养，每组设置3个复孔。收集各组细胞，用PBS洗涤2次，离心，弃上清液，加入RIPA细胞裂解液100 μL提取细胞总蛋白，于冰浴中放置30 min，于4 ℃下以1 500 r/min离心15 min；取上清液，采用BCA法测定蛋白浓度。将蛋白煮沸变性，取变性蛋白样品50 μg，以10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转至聚偏二氟乙烯膜上，用含50 g/L脱脂奶粉的TBST缓冲液封闭1 h，加入cleaved caspase-3、Bcl-2、Bax、β-actin一抗（稀释比例分别为1∶3 000、1∶2 000、1∶500、1∶2 000），于4 ℃孵育过夜；用TBST缓冲液反复洗膜3次，室温下加入二抗（稀释比例为1∶5 000）孵育1 h；用TBST缓冲液反复洗膜3次，显影、扫描图像，将胶片拍照后用凝胶图像处理系统分析，实验重复3次。用Image J软件分析各条带灰度值，以β-actin作为内参，检测各组cleaved caspase-3、Bcl-2、Bax蛋白的相对表达量（蛋白相对表达量＝目的蛋白条带灰度值/内参条带灰度值），并计算Bcl-2与Bax表达水平的比值。

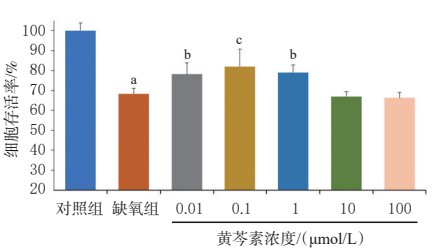
2.8 统计学方法

用GraphPad Prism 9.0软件进行数据统计分析。数据均以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 不同浓度黄芩素对缺氧RN-C细胞存活率的影响

结果如图1所示，经缺氧处理后细胞存活率显著下降（$P<0.01$）；与缺氧组细胞比较，0.01、0.1、1 μmol/L黄芩素处理组细胞存活率均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），提示上述浓度黄芩素可逆转缺氧处理后细胞存活率降低的现象，且0.1 μmol/L黄芩素效果最佳，故选择该浓度进行后续实验。



a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与缺氧组比较，$P<0.05$；c：与缺氧组比较，$P<0.01$

图1 不同浓度黄芩素对缺氧RN-C细胞存活率的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

3.2 黄芩素对缺氧RN-C细胞中LDH、SOD活性和MDA含量的影响

与对照组比较，缺氧组细胞上清液中LDH活性、细胞中MDA含量均显著升高，SOD活性显著降低（$P<0.01$）。与缺氧组比较，黄芩素组细胞上清液中LDH活性和细胞中MDA含量均显著降低，细胞中SOD活性显著升高（$P<0.01$）。结果见表1。

表1　黄芩素对缺氧RN-C细胞中LDH、SOD活性和MDA含量的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	LDH/(U/mL)	MDA/(nmol/mg prot)	SOD/(U/mg prot)
对照组	21.88±3.25	0.035±0.003	0.257±0.010
缺氧组	46.44±3.59[a]	0.072±0.004[a]	0.143±0.010[a]
黄芩素组	23.41±1.61[b]	0.034±0.004[b]	0.222±0.012[b]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与缺氧组比较，$P<0.01$

3.3　黄芩素对缺氧RN-C细胞迁移的影响

结果如图2所示，对照组、缺氧组和黄芩素组的细胞迁移率分别是（47.90±5.01）%、（35.03±5.38）%和（49.56±4.38）%（$n=6$）。与对照组比较，缺氧组细胞迁移率显著降低（$P<0.01$）；与缺氧组比较，黄芩素组细胞迁移率显著升高（$P<0.01$）。

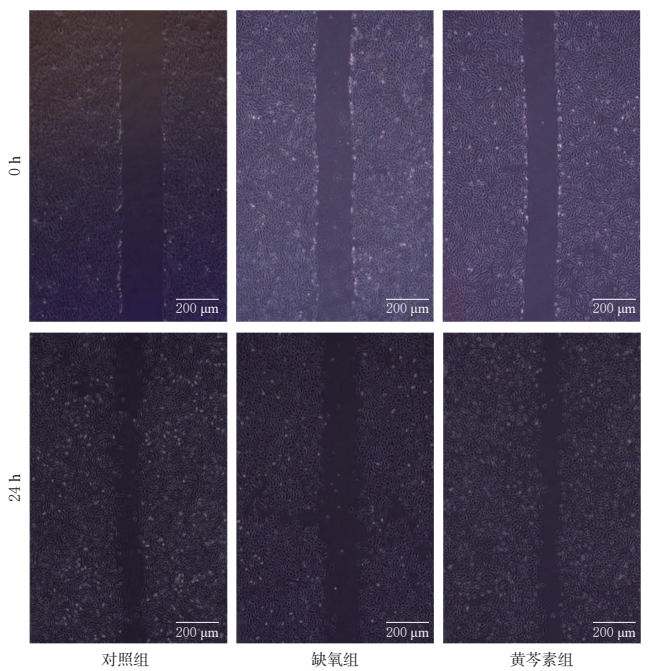


图2　黄芩素对RN-C细胞迁移的影响

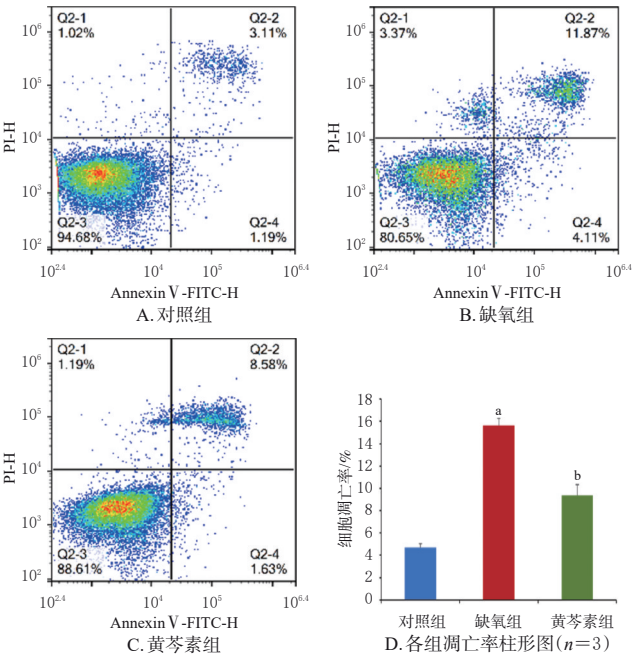
3.4　黄芩素对缺氧RN-C细胞凋亡率和细胞周期的影响

3.4.1　细胞凋亡率　结果如图3所示，与对照组比较，缺氧处理24 h后细胞凋亡率显著升高（$P<0.01$）；与缺氧组比较，黄芩素组细胞凋亡率显著降低（$P<0.01$）。

3.4.2　细胞周期　与对照组比较，缺氧组细胞G1期比例显著升高，G2+S期细胞比例显著降低（$P<0.01$）；与缺氧组比较，黄芩素组G1期细胞比例显著降低，G2+S期细胞比例显著升高（$P<0.01$）。结果见图4。

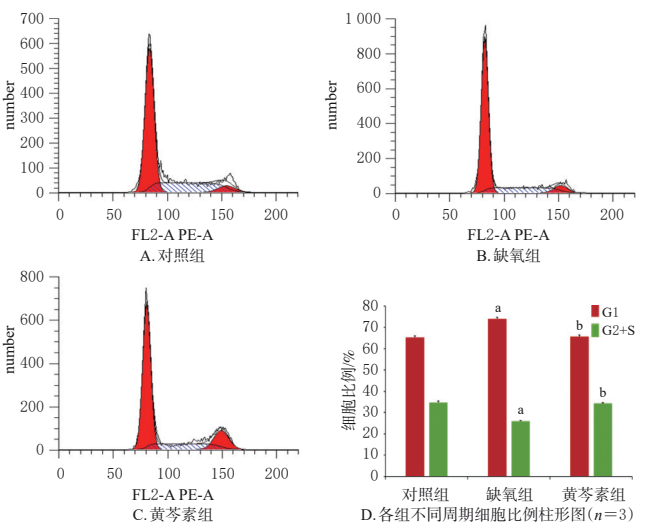
3.5　黄芩素对缺氧RN-C细胞中cleaved caspase-3、Bax、Bcl-2蛋白表达的影响

与对照组比较，缺氧组RN-C细胞中cleaved caspase-3蛋白的表达水平显著上升，Bcl-2/Bax比值显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）；与缺氧组比较，黄芩素组细胞中cleaved caspase-3蛋白的表达水平显著降低，Bcl-2/Bax比值显著上升（$P<0.01$）。结果见图5。



a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与缺氧组比较，$P<0.01$

图3　黄芩素对缺氧RN-C细胞凋亡的影响



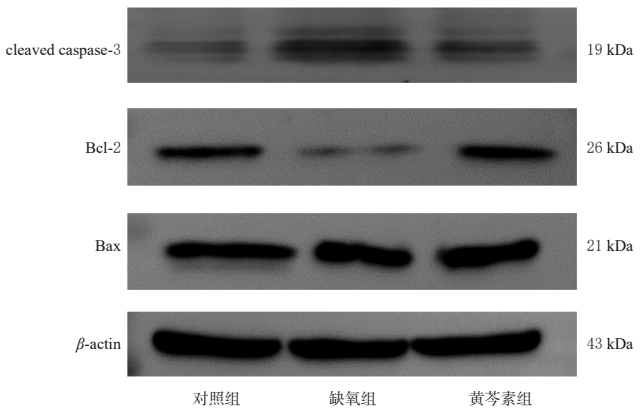
a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与缺氧组比较，$P<0.01$

图4　黄芩素对缺氧RN-C细胞周期的影响

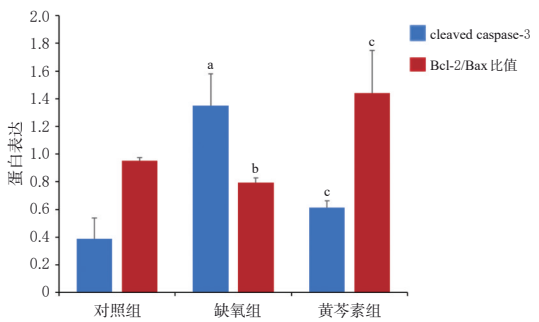
4　讨论

缺氧是高原反应、高原脑病的重要诱因，也是作为缺血性卒中、缺血性心脏病和许多其他疾病的主要病理机制[9]。黄芩素可通过多种机制对神经细胞起保护作用，此外黄芩素还显示出抗癫痫、抗帕金森和抗抑郁的特性，并可改善大脑认知功能[10]。研究表明，黄芩素可能通过下调ALOX15、p38 MAPK和PLA2的表达水平发挥对缺血缺氧导致的神经元损伤的保护作用[11]。最新研究表明，黄芩素对于高原缺氧导致的海马神经损伤具有明显的防护作用[12]。

本研究通过CCK-8法检测了RN-C细胞存活率，结果显示，在缺氧条件下培养24 h后，细胞存活率明显降



A. 各组凋亡相关蛋白表达电泳图



B. 各组 cleaved caspase-3 蛋白表达、Bcl-2/Bax 比值柱形图（$n=3$）

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与对照组比较，$P<0.05$；c：与缺氧组比较，$P<0.01$

图5　黄芩素对缺氧 RN-C 细胞中 cleaved caspase-3 蛋白表达、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

低，但经黄芩素干预后，RN-C 细胞存活率明显升高，提示黄芩素可提高细胞存活率，其中，0.1 μmol/L 的黄芩素对细胞存活率提升效果最佳，故本研究应用该浓度进行后续研究。

神经细胞的迁移与中枢神经系统的发育、神经细胞的分化密切相关，对于神经系统的形成、修复及其功能的正常发挥有着非常关键的作用[13]。本研究发现，缺氧条件下 RN-C 细胞的迁移能力明显减弱，经黄芩素处理后缺氧 RN-C 细胞的迁移能力显著提高，说明黄芩素对缺氧 RN-C 细胞的迁移能力具有改善作用。

SOD 和 MDA 是细胞损伤的抗氧化酶系统中的关键酶，它们的活性和含量变化能反映细胞的脂质过氧化水平和自由基水平。其中，SOD 可降低机体的氧化应激水平，是机体内重要的内源性自由基清除剂；而 MDA 含量高低则代表了机体的脂质过氧化损伤程度。缺氧会引起细胞代谢障碍，进而产生过量的氧自由基，又进一步导致氧自由基清除剂 SOD 的活性下降[14]。同时，缺氧会导致细胞产生过量的活性氧和氧化/抗氧化失衡。生物膜中含有丰富的不饱和脂肪酸，活性氧的过量蓄积极易引起细胞膜以及细胞器膜脂质过氧化，进而产生过量的脂质过氧化产物 MDA[14]。本研究中，缺氧 24 h 后，RN-C 细胞的 SOD 活性下降、MDA 含量升高，说明细胞对脂质过氧化物的清除能力下降进而导致氧自由基过度积累，脂质过氧化产物 MDA 大量增加，进一步加重了细胞的损伤。本研究还显示，缺氧组细胞上清液中 LDH 含量升高，可能是由于缺氧引起脂质过氧化损伤增加和抗氧化能力下降，导致细胞膜的完整性受到破坏，进而导致细胞膜通透性增加，使细胞中的 LDH 外漏到培养基中所致；而黄芩素组细胞上清液中 LDH 含量较缺氧组下降，表明黄芩素可通过调控氧化/抗氧化平衡保护细胞膜的完整性，减轻缺氧造成的细胞膜损伤，但具体机制有待进一步研究。

通过 Annexin Ⅴ-FITC/PI 双染流式细胞术检测皮质神经元细胞的凋亡情况，结果表明，缺氧条件下，RN-C 细胞凋亡率增加，黄芩素组凋亡率下降，说明黄芩素可减少缺氧诱导的 RN-C 细胞凋亡损伤。细胞周期检测结果表明，缺氧处理后，G1 期的细胞比例明显升高，相对应的 G2+S 期细胞比例明显降低，细胞周期阻滞在 G1 期，说明缺氧导致细胞增殖周期进程受阻，细胞增殖能力降低；经黄芩素干预后 G1 期的细胞比例明显降低，相对应的 G2+S 期细胞比例明显升高，说明黄芩素逆转了细胞周期阻滞的现象，促进了细胞增殖。细胞周期包括 G1 期、S 期、G2 期和 M 期，G1 期是细胞进入细胞分裂过程的限制点，在缺氧刺激下，细胞将停止细胞分裂过程，同时进行分裂前损伤修复，如果损伤无法修复，则细胞会发生凋亡或是进入失活状态 G0 期等待进一步的信号[15]。另一方面，细胞增殖能力减弱亦可以反向促进细胞凋亡进程[16]。本研究表明，黄芩素可减少缺氧引起的细胞凋亡，可能与减少缺氧 RN-C 细胞 G1 期细胞周期阻滞有关。

细胞凋亡是一种高度受控的细胞程序性死亡形式，可触发细胞自我毁灭而不受任何外部影响，是许多生理稳态和病理变化所必需的流程，以核固缩、细胞皱缩、细胞膜起泡和 DNA 片段化为特征。Bcl-2 家族蛋白是调控凋亡因子释放的主要分子，可分为促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白两类。Bcl-2 是主要的抗凋亡蛋白成员，其主要存在于线粒体膜上。Bax 是主要的促凋亡蛋白成员，一般存在于胞质中，当接收到凋亡信号时，Bax 重新定位于线粒体表面，释放凋亡因子。细胞凋亡过程由促凋亡分子和抗凋亡分子协同作用，二者比例的变化可通过线粒体途径共同决定细胞是否进入凋亡程序。caspase-3 是半胱氨酸蛋白酶的一族，是细胞凋亡的中心调节分子，与促凋亡信号紧密结合。正常情况下，caspase-3 以酶原的形式存在于胞质中，在接收到缺氧信号后，线粒体膜损伤，其被释放至胞质中，在凋亡通路被激活，caspase-3 可剪切为效应 cleaved caspase-3，从而执行凋亡程序[17]。本

研究结果表明，缺氧组细胞中效应蛋白cleaved caspase-3的表达水平较对照组显著升高，Bcl-2/Bax比值较对照组显著下降；而黄芩素可逆转这一现象。这提示，黄芩素可通过调控caspase-3/Bax/Bcl-2凋亡通路减少缺氧诱导的细胞凋亡。

综上所述，本研究证实黄芩素可以明显提高缺氧神经细胞的存活率，降低其上清液中LDH的活性，降低细胞脂质过氧化水平，提高缺氧细胞迁移能力，改善细胞周期阻滞，降低细胞凋亡率，可通过多环节对大鼠皮质神经元细胞起到抗缺氧的保护作用；caspase-3/Bax/Bcl-2通路可能是其发挥作用的关键通路。然而本课题仅初步探讨了黄芩素抗缺氧损伤的作用和机制，下一步将通过多组学手段系统分析黄芩素抗缺氧神经保护作用的具体机制，为该化合物应用于抗缺氧疾病的进一步开发提供理论依据。

参考文献

[1] CHEN P S, CHIU W T, HSU P L, et al. Pathophysiological implications of hypoxia in human diseases[J]. J Biomed Sci, 2020, 27(1): 63.

[2] LUO Z, TIAN M F, YANG G, et al. Hypoxia signaling in human health and diseases: implications and prospects for therapeutics[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 218.

[3] ZHANG P, CHEN J S, LI Q Y, et al. Neuroprotectants attenuate hypobaric hypoxia-induced brain injuries in cynomolgus monkeys[J]. Zool Res, 2020, 41(1): 3-19.

[4] 王维刚，阳志强，李晓琳，等. 抗缺氧中药研究进展[J]. 天然产物研究与开发，2022，34(2)：344-357.

[5] KE P Y, CHANG C W, HSIAO Y C. Baicalein activates parkin-dependent mitophagy through NDP52 and OPTN [J]. Cells, 2022, 11(7): 1132.

[6] 张冬梅，高迎春，张洁，等. 7-羟乙基白杨素对低压缺氧致PC12细胞损伤的改善作用及机制[J]. 中国药房，2023，34(4)：402-406，412.

[7] SURAWEERA C D, BANJARA S, HINDS M G, et al. Metazoans and intrinsic apoptosis: an evolutionary analysis of the Bcl-2 family[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(7): 3691.

[8] HU Z H, GUAN Y R, HU W Y, et al. An overview of pharmacological activities of baicalin and its aglycone baicalein: new insights into molecular mechanisms and signaling pathways[J]. Iran J Basic Med Sci, 2022, 25(1): 14-26.

[9] LI N, LI Q Y, BAI J R, et al. The multiple organs insult and compensation mechanism in mice exposed to hypobaric hypoxia[J]. Cell Stress Chaperones, 2020, 25(5): 779-791.

[10] JIN G, ARAI K, MURATA Y, et al. Protecting against cerebrovascular injury: contributions of 12/15-lipoxygenase to edema formation after transient focal ischemia[J]. Stroke, 2008, 39(9): 2538-2543.

[11] NITO C, KAMADA H, ENDO H, et al. Role of the p38 mitogen-activated protein kinase/cytosolic phospholipase A2 signaling pathway in blood-brain barrier disruption after focal cerebral ischemia and reperfusion[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(10): 1686-1696.

[12] CHOUDHARY R, KUMAR M, KATYAL A. 12/15-lipoxygenase debilitates mitochondrial health in intermittent hypobaric hypoxia induced neuronal damage: an *in vivo* study[J]. Redox Biol, 2022, 49: 102228.

[13] LIU B Y, LI L, LIU G L, et al. Baicalein attenuates cardiac hypertrophy in mice via suppressing oxidative stress and activating autophagy in cardiomyocytes[J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(5): 701-714.

[14] CHEN Y, LI N, WANG H J, et al. Amentoflavone suppresses cell proliferation and induces cell death through triggering autophagy-dependent ferroptosis in human glioma[J]. Life Sci, 2020, 247: 117425.

[15] LIU D X, GREENE L A. Neuronal apoptosis at the G1/S cell cycle checkpoint[J]. Cell Tissue Res, 2001, 305(2): 217-228.

[16] KNORR D Y, GEORGES N S, PAULS S, et al. Acetylcholinesterase promotes apoptosis in insect neurons[J]. Apoptosis, 2020, 25(9/10): 730-746.

[17] COIMBRA-COSTA D, GARZÓN F, ALVA N, et al. Intermittent hypobaric hypoxic preconditioning provides neuroprotection by increasing antioxidant activity, erythropoietin expression and preventing apoptosis and astrogliosis in the brain of adult rats exposed to acute severe hypoxia[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(10): 5272.

（收稿日期：2022-10-27　修回日期：2023-03-13）

（编辑：曾海蓉）