

金雀异黄酮通过PI3K/AKT/COX-2信号通路调控小胶质细胞极化减轻大鼠脑缺血/再灌注诱导的炎症损伤

李梦佳^{1,2}, 汪梦哲^{1,2}, 陶宇^{2,3}, 庞懿轩^{2,3}, 李丽^{1,2}, 张小楠^{1,2}, 赵士弟^{1,2}

蚌埠医科大学¹病理生理学教研室,²心脑血管疾病基础与临床重点实验室,³第一临床医学院,安徽蚌埠 233000

摘要:目的 探讨金雀异黄酮(GEN)通过PI3K/AKT/COX-2信号通路减轻脑缺血/再灌注诱导的小胶质细胞神经炎症反应,并阐明其对共培养神经元的保护作用。方法 在体实验采用SD大鼠构建I/R模型,分为对照组(CON组)、缺血/再灌注组(I/R组)、不同剂量GEN预处理组(I/R+GEN25/50/100 mg/kg),10只/组,检测小胶质细胞极化标志物(CD86、CD206)、炎症因子及PI3K、AKT、COX-2表达。离体实验选用BV2细胞建立OGD/R模型,筛选GEN无毒性浓度,实验分为正常培养组(CON组)、氧糖剥夺/复氧模型组(OGD/R组)、GEN干预组(OGD/R+GEN组)、PI3K敲低模型组(si-PI3K+OGD/R组)、PI3K敲低联合GEN干预组(si-PI3K+OGD/R+GEN组)、PI3K激动剂模型组(740Y-P+OGD/R组)以及PI3K激动剂联合GEN干预组(740Y-P+OGD/R+GEN组),检测小胶质细胞极化表型变化、炎症因子与PI3K、AKT、COX-2表达。神经元-小胶质细胞共培养体系检测神经元凋亡率、细胞活性以及相关凋亡蛋白的表达变化。结果 与CON组比,I/R组小胶质细胞呈M1型极化(CD86、IL-6、IL-8、IL-1 β 、TNF- α 、PI3K、AKT、COX-2上调,IL-4、TGF- β 下调, $P<0.0001$)。GEN干预可逆转此现象,抑制M1极化、促炎因子及PI3K/AKT/COX-2通路,促进M2极化(CD206、IL-5、IL-10、IL-4、TGF- β 上调, $P<0.01$)。COX-2抑制剂(Celecoxib)效果与GEN类似,均能下调M1标志物及TNF- α 、PI3K、AKT、COX-2,上调M2标志物与TGF- β ($P<0.0001$)。OGD/R诱导的小胶质细胞M1极化与促炎反应同样被GEN抑制,表现为CD86、IL-1 β 、IL-6下调,CD206、IL-4、IL-10上调($P<0.01$)。敲低PI3K模拟了GEN的保护效应(M1/促炎因子下调,M2/抗炎因子上调, $P<0.05$),而激活PI3K(740Y-P)则抵消了GEN的部分效果。在神经元-小胶质细胞共培养体系中,GEN处理降低OGD/R诱导的神经元凋亡率,恢复细胞活力,并伴随Cleaved Caspase-3、Bax下调及Bcl-2、BDNF上调($P<0.05$)。结论 GEN下调PI3K/AKT/COX-2通路调控小胶质细胞向M2型极化,减轻脑缺血/再灌注诱导的神经炎症损伤。

关键词:金雀异黄酮;脑缺血/再灌注;氧糖剥夺/复氧细胞模型;小胶质细胞极化;神经炎症;PI3K/AKT/COX-2通路

Genistein alleviates cerebral ischemia/reperfusion-induced inflammatory injury in rats by regulating microglial polarization via the PI3K/AKT/COX-2 signaling pathway

LI Mengjia^{1,2}, WANG Mengzhe^{1,2}, TAO Yu^{2,3}, PANG Yixuan^{2,3}, LI Li^{1,2}, ZHANG Xiaonan^{1,2}, ZHAO Shidi^{1,2}

¹Department of Pathophysiology, ²Key Laboratory of Basic and Clinical Research on Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases, ³First Clinical Medical College, Bengbu Medical University, Bengbu 233000, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of genistein for alleviating cerebral ischemia/reperfusion (I/R)-induced neuroinflammation in microglia and its protective effects on co-cultured neurons. **Methods** Male SD rats were divided into control group, I/R group, and 3 genistein groups treated with 25, 50 or 100 mg/kg genistein before I/R modeling ($n=10$), and the expressions of microglial polarization markers CD86 and CD206, inflammatory cytokines, PI3K, AKT, and COX-2 were examined. In cultured BV-2 cells with oxygen-glucose deprivation/reperfusion (OGD/R), the effects of genistein, si-PI3K, genistein combined with si-PI3K, 740Y-P (a PI3K agonist), or 740Y-P with genistein on microglial polarization, inflammatory factors, and PI3K, AKT and COX-2 expressions were assessed. In a neuron-microglia co-culture system, the changes in neuronal apoptosis rate, cell viability, and apoptosis-related proteins in response to genistein treatment were detected. **Results** The rat models of I/R exhibited obvious M1 polarization of the microglia, as shown by upregulated CD86, IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF- α , PI3K, AKT, and COX-2 expressions and downregulated IL-4 and TGF- β expressions. Genistein treatment effectively reversed M1 polarization of the microglia, downregulated pro-inflammatory factors and the PI3K/AKT/COX-2 pathway, and promoted M2 polarization of the microglia in the mouse models. The COX-2 inhibitor celecoxib produced similar effects to genistein by decreasing the expressions of M1 markers, TNF- α , PI3K, AKT, and COX-2 and increasing M2 markers and TGF- β expression. In cultured BV-2 cells, genistein significantly inhibited OGD/R-induced M1 polarization and pro-inflammatory responses, and such protective effects were mimicked by PI3K knockdown, whereas PI3K activation by 740Y-P partially counteracted the effects of genistein. In the neuron-microglia co-culture system, genistein obviously reduced OGD/R-induced neuronal apoptosis, enhanced cell viability, decreased cleaved caspase-3 and Bax expressions, and increased Bcl-2 and BDNF expressions. **Conclusion** Genistein alleviates cerebral I/R-induced neuroinflammatory injury in rats by promoting M2 polarization of the microglia via downregulating the PI3K/AKT/COX-2 pathway.

Keywords: genistein; cerebral ischemia-reperfusion; oxygen-glucose deprivation/reperfusion; microglia polarization; neuroinflammation; PI3K/AKT/COX-2 pathway

收稿日期:2026-01-23

基金项目:安徽省教育厅自然科学重大项目(KJ2021ZD0091);
国家级大学生创新项目(202410367022)

作者简介:李梦佳,在读硕士研究生,E-mail: 2325510327@qq.com

通信作者:赵士弟,硕士生导师,E-mail: zhdsdi@126.com;张小楠,博士,
讲师,E-mail: zhangxn@bbmu.edu.cn

缺血性脑卒中(IS)作为临床最常见的脑血管疾病^[1],其核心病理特征是脑组织血流灌注不足导致的神经细胞缺血缺氧性损伤。尽管溶栓和血管再通技术已成为临床主要治疗手段,但治疗时间窗的限制和血流再

灌注过程引发的脑缺血/再灌注损伤(CIRI)严重影响了治疗效果。CIRI涉及氧化应激、钙超载、自噬失衡、程序性死亡和炎症级联反应等多维度病理生理过程,这些相互交织的机制最终导致不可逆的神经元损伤和细胞死亡^[2,3]。

在CIRI复杂机制中,神经炎症反应扮演着关键角色^[4]。小胶质细胞作为中枢神经系统的主要免疫效应细胞,其功能极化状态直接决定了神经炎症损伤与修复的平衡^[5,6]。在缺血/再灌注过程中,小胶质细胞由静息态转向促炎表型(M1)和抗炎表型(M2),这种极化失衡是导致神经炎症持续发展的重要因素^[7,8]。CIRI早期,前列腺素E₂(PGE₂)受体持续激活,触发小胶质细胞发生M1极化,进而增强缺血半影区的神经炎症破坏作用。PGE₂合成限速酶环氧化酶-2(COX-2)调控PGE₂合成进而影响其受体持续激活在脑缺血/再灌注诱导的神经炎症损伤效应^[9,10]。

金雀异黄酮(GEN)具有天然异黄酮的雌激素样作用,广泛存在于豆科植物中,表现出抗氧化、抗炎、抗A β 沉积和促自噬等作用。GEN可通过调控PI3K/AKT通路介导抗肿瘤、神经保护及代谢调节等多种生物学效应^[11-13]。在脑缺血/再灌注损伤中,PI3K/AKT信号通路是炎症反应的关键调控枢纽^[14],该通路还可通过磷酸化级联反应正向调控COX-2/PGE₂信号^[15]。GEN是否通过调控PI3K/AKT/COX-2减轻脑缺血/再灌注诱导的神经炎症性损伤尚未见报道。

本研究通过大鼠MCAO及BV2细胞OGD/R模型施以GEN预处理,探讨GEN是否通过PI3K/AKT/COX-2通路调控小胶质细胞极化减轻脑缺血/再灌注诱导的神经元炎症性损伤。深入理解这一调控,对于开发新型神经保护药物、改善缺血性脑卒中临床预后具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞 BV2(CL-0493,武汉普诺赛实验细胞有限公司)保留了BV2的多种特征,常用于神经炎症和免疫相关的研究;小鼠皮层神经元细胞(武汉普诺赛实验细胞有限公司)与小鼠海马体神经元细胞(HT22,上海NEWZERUM有限公司)常用于研究神经元的功能与损伤。

1.1.2 实验动物 SPF级成年雄性SD大鼠(250~280 g),购自合肥青源生物科技有限公司,均在适当的密度下饲养,环境、温度、湿度适宜,光照/黑暗周期为12 h/12 h,自由饮水和进食。所有动物实验均经蚌埠医科大学动物研究伦理委员会批准(伦理批号:[2022]第213号)。

1.1.3 主要试剂和仪器 GEN(麦克林);栓线(西浓科技);2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC,索莱宝);HE染料、

羊抗兔IgG-HRP、FITC标记的山羊抗兔二抗(白鲨科技);PhosStop磷酸酶抑制剂(Roche);蛋白酶抑制剂、RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天);CD86、CD206抗体(华安生物技术);PI3K、AKT、p-AKT(CST);COX-2抗体、Cy3标记的山羊抗兔二抗(三鹰生物技术);p-PI3K(Affinity);Cleaved Caspase-3(正能生物技术);Bax、Bcl-2(合肥善本技术有限公司); β -actin(爱博泰克生物科技);HiScript RT Kit逆转录试剂盒(诺唯赞生物科技);ELISA试剂盒和流式细胞凋亡检测试剂盒(Elabscience);曝光仪、电泳仪、转膜仪(Bio-Rad);高端倒置荧光显微镜Observer Z1(蔡司);流式细胞仪(贝克曼)。

1.2 方法

1.2.1 动物实验分组及给药 雄性SPF级雄性SD大鼠(250 g~280 g)适应性喂养1周,采用随机数法将50只大鼠随机分为5组:对照组(CON组)、脑缺血/再灌注模型组(I/R组)、金雀异黄酮低、中、高剂量预处理组I/R+GEN(25 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg)、10只/组。I/R+GEN低、中、高剂量组大鼠分别给予25、50、100 mg/kg的金雀异黄酮进行灌胃处理,1次/d,灌胃21 d后构建脑缺血/再灌注模型。CON组和I/R组给予等体积生理盐水灌胃21 d后,I/R组进行脑缺血/再灌注模型。

1.2.2 细胞实验分组

1.2.2.1 GEN对BV2极化的调控作用 实验分组为:正常培养(CON组)、氧糖剥夺/复氧模型组(OGD/R组)、GEN干预组(OGD/R+GEN组),通过OGD/R模型模拟脑缺血/再灌注损伤,Western blotting分析BV2极化标志物(CD86/CD206);逆转录实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测促炎因子IL-1 β /IL-6、抗炎因子IL-4/IL-10;免疫荧光染色直观BV2极化标志物(CD86/CD206)表达水平、ELISA法检测细胞培养上清中促炎因子IL-1 β 、抗炎因子IL-4的水平。

1.2.2.2 GEN对PI3K/AKT/COX-2通路及BV2极化状态的影响 实验分组:正常培养(CON组)、氧糖剥夺/复氧模型组(OGD/R组)、GEN干预组(OGD/R+GEN组)、PI3K敲低模型组(si-PI3K+OGD/R组)、PI3K敲低联合GEN干预组(si-PI3K+OGD/R+GEN组)、PI3K激动剂模型组(740Y-P+OGD/R组)以及PI3K激动剂联合GEN干预组(740Y-P+OGD/R+GEN组)。通过Western blotting技术检测通路关键蛋白(p-PI3K、p-AKT、COX-2)及BV2极化标志物(CD86/CD206)的表达水平;RT-qPCR分析促炎因子IL-1 β 、抗炎因子IL-4的mRNA表达变化。

1.2.2.3 GEN调控BV2表型转换对OGD/R神经元的影响 采用Transwell共培养体系,建立小室上层BV2与小室下层小鼠皮质神经元/HT22的间接共培养模型。

实验分组为:正常培养(CON组)、氧糖剥夺/复氧模型组(OGD/R组)、GEN干预组(OGD/R+GEN组),通过流式细胞术检测神经元凋亡率,CCK-8法测定HT22活力,Western blotting分析HT22凋亡相关蛋白(Cleaved Caspase、Bax、Bcl-2)表达水平,以及RT-qPCR检测相关凋亡因子及神经营养因子(细胞凋亡因子Caspase/Bax/Bcl-2、神经营养因子BDNF)mRNA水平变化。

1.2.3 脑缺血/再灌注在体模型—I/R模型 实验前,所有大鼠禁食12 h,自由饮水。通过腹腔注射1%戊巴比妥钠(40 mL/kg)进行麻醉。麻醉后,大鼠被置于仰卧位并固定于手术台,随后进行皮肤准备和消毒。

按改良的Longa方法建立大脑中动脉缺血/再灌注模型。在颈部正中切口,分离筋膜、肌肉和腺体组织,识别并分离右侧颈总动脉(CCA)和迷走神经。接着,分离颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)。结扎ECA和CCA的近心端,并在CCA远心端使用动脉夹夹闭。在分叉点5 mm处剪切,沿ICA插入栓塞线至大脑前动脉,形成大脑中动脉缺血。栓塞线在颈内动脉上固定2 h后拔出,以恢复脑血流,模拟急性脑缺血/再灌注过程。

1.2.4 脑缺血/再灌注离体模型——OGD/R模型 采用两阶段处理:首先在低氧培养箱(1% O₂、94% N₂、5% CO₂)中使用无糖培养基进行4 h氧糖剥夺(OGD阶段),模拟缺血性损伤;随后恢复常氧条件(21% O₂)和含糖培养基(DMEM)进行24 h复氧处理^[16,17],再现再灌注损伤过程。

1.2.5 脑组织HE染色 在再灌注24 h后,对大鼠实施麻醉。用0.9%生理盐水进行心脏灌注,随后以4%多聚甲醛进行固定,直至肺部变白。固定后的大脑组织在4℃下保存。次日,进行梯度酒精组织脱水、浸蜡、包埋,最后制备石蜡切片并进行HE染色。

1.2.6 脑梗死体积及行为学评分与TTC染色 在脑缺血/再灌注模型建立后24 h,系统实施神经功能评估与组织样本采集流程。采用Longa五分制评估体系进行神经功能量化分析:0分表征无神经损伤体征;1分提示对侧前肢伸展受限;2分定义为自主运动时出现同侧旋转行为;3分表现为运动失衡性倾倒;4分对应意识丧失伴运动功能完全缺失。严格筛选神经功能评分1~3分的实验个体(剔除极端值样本)以确保模型稳定性,并通过分层随机抽样策略从各组选取5例符合标准的大鼠进行后续分析,该样本量经功效分析验证具有统计学效力。使用戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射深度麻醉后,分别执行两种组织处理方案:快速剥离全脑组织经预冷PBS(4℃,pH=7.4)3次漂洗清除表面杂质后,立即置于液氮速冻5 min,转存-80℃超低温冰箱保存用于分子生物学检测;实施经心灌注预处理,依次灌注0.9%生理盐水(200 mL,4℃)清除循环血液,继而灌注4%多聚甲

醛(PFA,pH7.4,300 mL)进行组织原位固定,待肺叶呈现均匀苍白色后完整取脑,后固定于新鲜PFA溶液(4℃,24 h)以备形态学研究。所有组织处理阶段均设置空白对照切片,并由双盲评估人员使用图像分析系统(Image-Pro Plus 6.0)定量分析神经元损伤程度,确保数据获取的客观性。

1.2.7 GEN药物筛选-BV2毒性检测 CCK-8法检测GEN对BV2毒性作用,本实验采用CCK-8法系统检测不同浓度GEN对BV2的毒性作用。将处于对数生长期的BV2细胞以 6×10^3 /孔的密度接种于96孔板,37℃、5% CO₂孵育24 h使其完全贴附。随后更换含不同浓度GEN(0、5、10、15、20、25、30 μmol/L)的新鲜培养基,每组设5个重复孔,继续培养24 h。药物干预后,每孔添加10 μL CCK-8溶液,37℃孵育2 h,用酶标仪测定吸光度 $A_{450\text{nm}}$ 。通过公式计算细胞存活率: $[(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$,并利用GraphPad Prism进行非线性回归分析。实验控制DMSO终浓度 $\leq 0.1\%$,并通过预实验确定最佳CCK-8孵育时间。该实验可准确评估GEN对BV2的毒性效应,为后续实验给药浓度提供剂量选择依据。

1.2.8 CCK-8法评估细胞活力 细胞接种阶段,采用96孔板设置20 000~0/孔的多梯度细胞密度(20 000、10 000、5000、2500、1250、625、0/孔),使用含10%胎牛血清和1%双抗的DMEM培养基,在37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h使细胞充分贴壁。CCK-8试剂孵育时间1~3 h。严格遵循试剂盒说明书操作规范,在避光条件下每孔加入10 μL CCK-8溶液,继续培养2 h后,使用酶标仪在450 nm主波长和630 nm参考波长下同步检测吸光度值,采用线性拟合法数据分析,以R²值作为主要判断依据。运用GraphPad Prism 9软件统计分析数据,计算细胞活力或抑制率等参数。

1.2.9 Western blotting检测相关蛋白表达水平 在体实验于再灌注24 h后取缺血半影区脑组织80 mg裂解,离心取上清提取总蛋白,SDS-PAGE凝胶进行电泳分离组织中的蛋白质,湿转法转移蛋白至PVDF膜,快速封闭液封闭。然后将膜与CD86(1:4000)、CD206(1:1000)、PI3K(1:500)、AKT(1:500)、COX-2(1:1000)和β-actin(1:50 000)的一抗在4℃条件下孵育过夜,TBST洗涤3次,10 min/次,室温孵育山羊抗兔二抗IgG-HRP(稀释比例为1:10 000)1.5 h,TBST洗涤3次,10 min/次,ECL发光法来检测膜上的蛋白;离体实验复氧24 h后取细胞并裂解,取蛋白上清BCA测定蛋白浓度、变性、上样(30 μg)、电泳、转膜、5%脱脂牛奶或5%BSA封闭2 h,CD86(1:1000)、CD206(1:3000)、p-PI3K(1:1000)、PI3K(1:1000)、AKT(1:1000)、p-AKT(1:1000)、COX-2(1:2000)和Cleaved Caspase-3(1:1000);Bax(1:2000)、

Bcl-2(1:2000)抗体,4℃摇床孵育过夜;TBST洗膜3次,二抗室温孵育2h;TBST洗膜3次,滴加化学发光液显影。

1.2.10 逆转录实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测炎症因子水平 RNA反转录采用20μL反应体系:1μg总RNA经gDNA Wipe Mix(4μL)预处理(42℃2min)去除基因组DNA污染,随后加入HiScript III Mix(4μL)进行反转录(37℃,15min),85℃灭活酶后,cDNA产物分装保存于-80℃(冻融≤3次)。在冰上避光条件下配

制20μL qPCR体系,包含10μL 2×SYBR Mix、上下游引物各0.4μL(200nmol/L)、2μL cDNA模板(10~100ng),余量用RNase-free水补足至7.2μL。扩增程序为95℃预变性3min,接着40次循环(95℃10s,60℃30s),最后通过熔解曲线(60~95℃)验证扩增特异性。数据分析采用 $\Delta\Delta CT$ 法,以 β -actin为内参,计算基因的相对表达量($2^{-\Delta\Delta CT}$)。所有引物信息由上海生工生物有限公司合成设计(表1)。

表1 引物合成序列信息
Tab.1 Primer sequences for RT-qPCR

Name	Primer sequence 5'-3'	
IL-4	F: GGTCTCAACCCCCAGCTAGT	R: GCCGATGATCTCTCTCAAGTGAT
IL-6	F: CTTCTTGGGACTGATGCTGGTGAC	R: TCTGTTGGGAGTGGTATCCTCTGTG
IL-10	F: TCCCTGGGTGAGAAGCTGAAGAC	R: CACCTGCTCCACTGCCTTGC
IL-1 β	F: CACTACAGGCTCCGAGATGAACAAC	R: TGTCGTTGCTTGGTTCTCCTTGATC
COX-2	F: TTCAACACACTCTATCACTGGC	R: AGAAGCGTTTGCGGTACTCAT
PI3K	F: CGAGAAGACGTGGAATGTCTG	R: GACTTCGCGCTCTACCACTA
AKT	F: GCCTCTGCTTTGTCTATGGAG	R: AGCATGAGGTTCTCCAGCTT
β -actin	F: GGCTGTATTCCCCTCCATCG	R: CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
Caspase-3	F: GTCATCTCGCTCTGGTACGG	R: CACACACACAAAGCTGCTCC
Bcl-2	F: CTTCTCTCGTCGCTACCGTC	R: CAATCCTCCCCAGTTTACC
Bax	F: CACCTGAGCTGACCTTGGAG	R: CAAACATGTCAGCTGCCACC
BDNF	F: TACCTGGATGCCGCAAACAT	R: CCAGACATGTCCACTGCAGT
β -actin	F: TATAAAACCCGGCGGCGCA	R: TCATCCATGGCGAACTGGTG
TNF- α	F: CGTCAGCCGATTTGCCATTT	R: TCCCTCAGGGGTGTCCTTAG
IL-1 β	F: ACAACTGCACTACAGGCTCC	R: GCTTGGGATCCCACTCTCC
IL-6	F: GCAAGAGACTTCCAGCCAGT	R: AGTCTCCTCTCCGGAAGTTG
IL-5	F: GGATGCTTCTGTGCTGAACG	R: TCAACAGAGCTCGGTGAGTG
IL-10	F: CCCTGTAGCCACCCAACAAA	R: GCAAGAGATCTGACTCCGGG
IL-8	F: CTCTGCTCACAACAGCGTC	R: TCTCTGAGTGGCATGGGACA
IL-4	F: GTACCGGGAACGGTATCCAC	R: GTGAGTTCAGACCGCTGACA
TGF- β	F: AGGGCTACCATGCCAACTTC	R: CCACGTAGTAGACGATGGGC
PGE2	F: GCTCCTTGCTTTCACAATCT	R: AGGACCGGTGGCCTAAGTAT

F: Forward primer, R: Reverse transcription.

1.2.11 ELISA检测细胞上清中炎症因子水平 将细胞上清通过0.22μm滤膜过滤,同时将标准品按5~7个浓度梯度稀释;随后进行加样与孵育,每孔加入100μL样本或标准品(设3个复孔),37℃孵育90min使抗原-抗体充分结合,再用PBST洗涤5次去除未结合物质;接着通过信号放大步骤,将生物素化检测抗体和HRP标记链霉亲和素依次加入,进行37℃避光孵育90min,随后加入TMB底物溶液显色15min和终止液终止反应,最终使用酶标仪测定吸光度 A_{450nm} 。通过拟合标准曲线($R^2\geq 0.99$)计算待测物浓度。

1.2.12 免疫荧光检测蛋白标记物 在体取脑组织制备冰冻切片,经DHE和Fluo-4探针染色及DAPI核染后封片,荧光显微镜观察并用ImageJ分析。离体细胞经固定、透化、封闭,与一抗4℃孵育过夜,荧光二抗染色,DAPI复染,封片后倒置荧光显微镜观察,ZEN软件处理图像。

1.2.13 Annexin V-FITC/P双染法流式检测细胞凋亡 将贴壁细胞用胰酶完全消化,300×g离心5min,PBS洗涤2次去除残留酶;其次进行染色,取 1×10^5 细胞重悬于100μL结合缓冲液,加入5μL Annexin V-FITC和5μL

PI(50 $\mu\text{g/mL}$),避光孵育 20 min;最后上机检测,用 400 μL 结合缓冲液稀释样本,300 目滤网过滤后,通过流式细胞仪(488 nm 激发光,FITC 检测通道 530/30 nm,PI 通道 >575 nm)采集至少 10000 个细胞数据,最后用 FlowJo 10.0 软件分析。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9 进行数据深度分析,通过单因素方差分析揭示多组间的显著差异,并以均数 $\pm$ 标准差描述结果分布, $P<0.05$ 时认为差异有统计学意义。

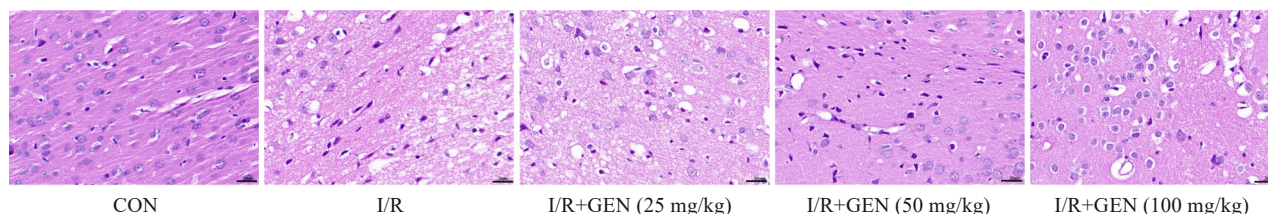


图1 各组大鼠脑组织染色结果

Fig.1 HE staining of brain tissues of rats with sham operation (CON), cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury and genistein (GEN) pretreatment before modeling (Scale bar=20 μm).

2.2 GEN 对 I/R 模型 BV2 蛋白标记物 CD86、CD206 表达的影响

Western blotting 分析结果显示:与对照组相比,I/R 组的小胶质细胞 CD86 的蛋白表达显著上调($P<0.0001$),CD206 的蛋白表达下调($P<0.0001$);与 I/R 组的 CD86 表达相比,I/R+GEN (25 mg/kg) 组($P<0.0001$),I/R+GEN (50 mg/kg) 组($P<0.0001$),I/R+GEN (100 mg/kg) 组($P<0.0001$)均有所下降,与 I/R 组的 CD206 表达相比,I/R+GEN (25 mg/kg) 组($P<0.0001$),I/R+GEN (50 mg/kg) 组($P<0.0001$),I/R+GEN (100 mg/kg) 组($P<0.01$)均升高(图 2A)。免疫荧光染色结果显示:与 I/R 组相比,GEN 预处理组的 CD86 表达 I/R+GEN (25 mg/kg) 组($P<0.0001$),I/R+GEN (50 mg/kg) 组($P<0.0001$),I/R+GEN (100 mg/kg) 组($P<0.0001$)均有所下降;同时与 I/R 组的 CD206 表达相比,I/R+GEN (25 mg/kg) 组($P<0.0001$),I/R+GEN (50 mg/kg) 组($P<0.0001$),I/R+GEN (100 mg/kg) 组($P<0.0001$)均有增多(图 3)。

2.3 GEN 对 I/R 模型大鼠脑组织炎症因子分泌水平的影响

RT-qPCR 检测结果显示:与对照组相比,I/R 组的促炎因子 IL-6($P<0.0001$)、IL-8($P<0.0001$) mRNA 表达均明显升高。而与 I/R 组对照,I/R+GEN (25 mg/kg) 组的 IL-6($P<0.0001$)、IL-8($P<0.0001$),I/R+GEN (50 mg/kg) 组的 IL-6($P<0.0001$)、IL-8($P<0.0001$),I/R+GEN (100 mg/kg) 组的 IL-6($P<0.0001$)、IL-8($P<0.0001$)均有所下降。在抑炎因子方面,与对照组相比,I/R 组的 IL-5($P<0.0001$)、IL-10($P<0.05$) mRNA 表达均降低。而与 I/

2 结果

2.1 各组大鼠脑组织 HE 染色

HE 染色结果显示,对照组的大鼠脑组织结构均匀完整,细胞排列清晰整齐且未见坏死细胞。相比于对照组,I/R 组的大鼠脑组织的细胞排列紊乱,细胞点状坏死增加及炎性细胞浸润和气球样变,渗出明显。与 I/R 组相比,I/R+GEN (25 mg/kg)、I/R+GEN (50 mg/kg)、I/R+GEN (100 mg/kg) 组对大鼠脑缺血/再灌注损伤所致炎症坏死等病变均有所改善(图 1)。

R 组相比,I/R+GEN (25 mg/kg) 组的 IL-5($P<0.0001$)、IL-10($P<0.0001$),I/R+GEN (50 mg/kg) 组的 IL-5($P<0.0001$)、IL-10($P<0.0001$),I/R+GEN (100 mg/kg) 组的 IL-5($P<0.0001$)、IL-10($P<0.0001$)均有所升高。50 mg/kg GEN 剂量组在抑制促炎因子表达和促进抗炎因子生成方面均表现出最优效果,该剂量被确定为后续实验的最佳给药浓度(图 2B)。

2.4 GEN 对脑缺血/再灌注大鼠脑梗死体积的影响

对 GEN 各组 and I/R 组进行行为学检测,相比于对照组,I/R 组大鼠神经功能受损严重($P<0.001$,图 4B);同 I/R 组相比,I/R+GEN (50 mg/kg) 组的神经缺损有所好转($P<0.05$,图 4B)。TTC 染色技术定量评估大鼠脑梗死区域体积,实验结果表明,对照组脑组织无显著梗死区域,而 I/R 组脑组织有明显的梗死区,两组间差异具有统计学意义($P<0.001$,图 4C)。相比于 I/R 组,I/R+GEN (50 mg/kg) 组的脑梗死体积降低($P<0.01$,图 4C)。

2.5 GEN 对 PI3K/AKT/COX-2 信号通路及炎症因子分泌水平的影响

Western blotting 检测各组样本中 PI3K、AKT 和 COX-2 蛋白的表达水平。结果显示,同对照组相比,I/R 组中 PI3K($P<0.0001$)、AKT($P<0.0001$)和 COX-2($P<0.0001$)蛋白的表达水平均有所升高,表明缺血/再灌注损伤可能通过激活 PI3K/AKT 信号通路及上调 COX-2 表达。与 I/R 组相比,I/R+GEN 组 (50 mg/kg) 的 PI3K($P<0.001$)、AKT($P<0.001$)和 COX-2($P<0.001$)蛋白表达水平降低。与对照组相比,CON+GEN (50 mg/kg) 组的蛋白表达无统计学差异。经 GEN 干预后,再灌注损伤模型中的 PI3K/AKT/COX-2 通路关键蛋白表达水平均

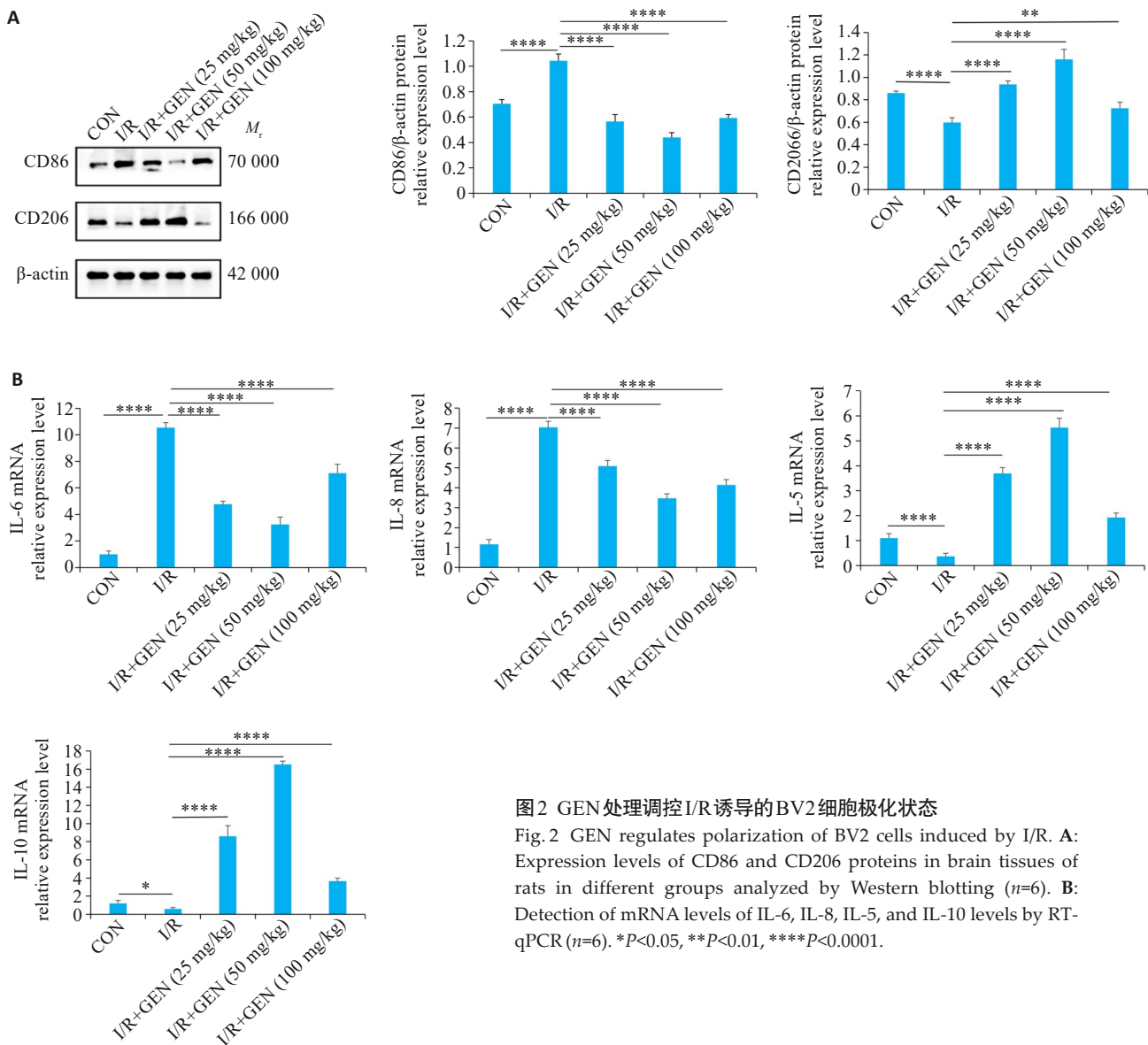


图2 GEN处理调控I/R诱导的BV2细胞极化状态

Fig. 2 GEN regulates polarization of BV2 cells induced by I/R. **A**: Expression levels of CD86 and CD206 proteins in brain tissues of rats in different groups analyzed by Western blotting ($n=6$). **B**: Detection of mRNA levels of IL-6, IL-8, IL-5, and IL-10 levels by RT-qPCR ($n=6$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$.

显著下调,而该干预对正常脑组织中的同通路蛋白未产生显著影响(图5A)。

RT-qPCR结果显示,与对照组相比,I/R组 TNF- α ($P<0.0001$)和 IL-1 β ($P<0.0001$)的 mRNA 表达水平增高。与 I/R 组相比,经金雀异黄酮干预的 I/R+GEN 组(剂量为 50 mg/kg)提高了 TGF- β ($P<0.0001$)和 IL-4 ($P<0.0001$)的 mRNA 表达水平。与对照组相比,CON+GEN (50 mg/kg) 组的蛋白表达差异无统计学意义(图 5B)。

2.6 GEN 对 PI3K/AKT/COX-2 信号通路及小胶质细胞极化的影响

Western blotting 分析结果显示:与对照组相比,I/R 组中 CD86 ($P<0.0001$)和 COX-2 ($P<0.0001$)的表达水平升高,而 CD206 ($P<0.0001$)的表达水平则有所降低。与 I/R 组相比,经金雀异黄酮(GEN,剂量为 50 mg/kg)和塞来昔布(Celecoxib,剂量为 25 mg/kg)干预的 I/R+GEN 组和 I/R+Celecoxib 组均降低了 CD86(均 $P<0.0001$)和

COX-2 ($P<0.0001$)的表达水平,同时提高了 CD206(均 $P<0.0001$)的表达水平。与 I/R+GEN (50 mg/kg) 组相比, I/R+Celecoxib (25 mg/kg) 组在 CD86、CD206 及 COX-2 的表达水平上均表现出相同趋势,但两组间的表达水平差异未达到统计学意义(图 6A)。RT-qPCR 结果显示,同对照组相比,I/R 组处理提高了促炎症因子 TNF- α 的表达 ($P<0.0001$),降低了抑炎因子 TGF- β 的表达 ($P<0.0001$);同 I/R 组相比,I/R+GEN (50 mg/kg) 组 TNF- α ($P<0.0001$)表达下降。相反在抑制炎症因子的实验中,同 I/R 组相比,I/R+GEN (50 mg/kg) 组的抗炎因子 TGF- β 的 mRNA 表达水平提高 ($P<0.0001$)。I/R+GEN (50 mg/kg) 和 I/R+Celecoxib (25 mg/kg) 组的抗炎因子和抑炎因子表达差异均无统计学意义(图 6B)。

2.7 GEN 对小胶质细胞前列腺素 E2 释放的影响

免疫荧光结果显示,同对照组相比,I/R 组的前列腺素荧光强度明显增强 ($P<0.0001$),CON+GEN 组荧光强度无明显增强。同 I/R 组相比,I/R+GEN 组的荧光强

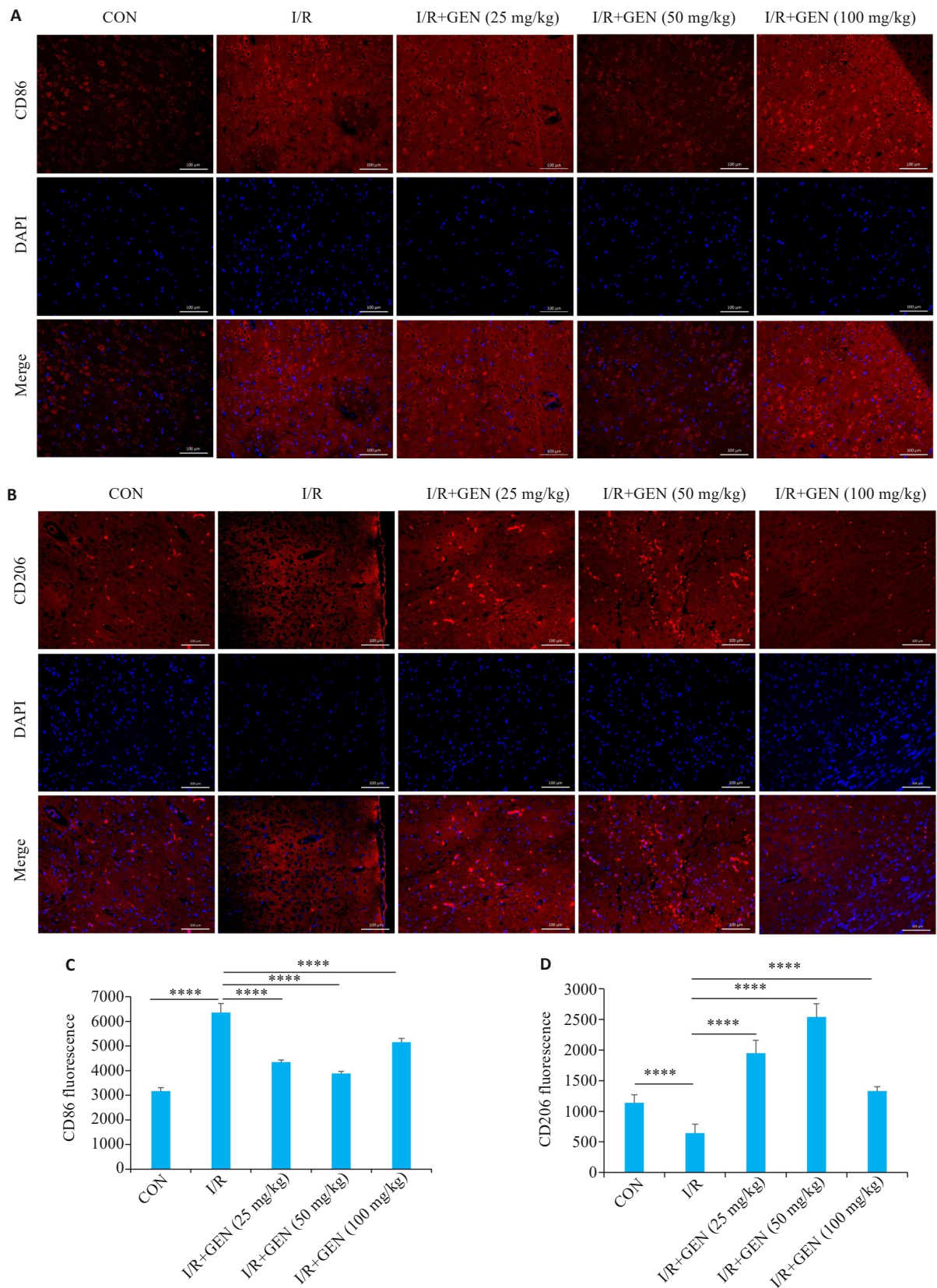


图3 各组大鼠脑组织中 CD86 和 CD206 的水平
Fig.3 Expression levels of CD86 and CD206 in brain tissues of rats in different groups detected by immunofluorescence staining ($n=6$). A: CD86 staining (Original magnification: $\times 200$). B: CD206 staining ($\times 200$). C: Average fluorescence intensity of CD86. D: Average fluorescence intensity of CD206. **** $P<0.0001$.

度降低($P<0.0001$,图 7A、B)。RT-qPCR 结果也显示 GEN 处理后的 PGE2 的 mRNA 表达相比于 I/R 组降低($P<0.0001$,图 7C)。

2.8 CCK-8 法评估 GEN 对 BV2 的细胞毒性及最佳药物浓度选择
实验浓度范围(最高至 $30\text{ }\mu\text{mol/L}$)内,溶剂 DMSO

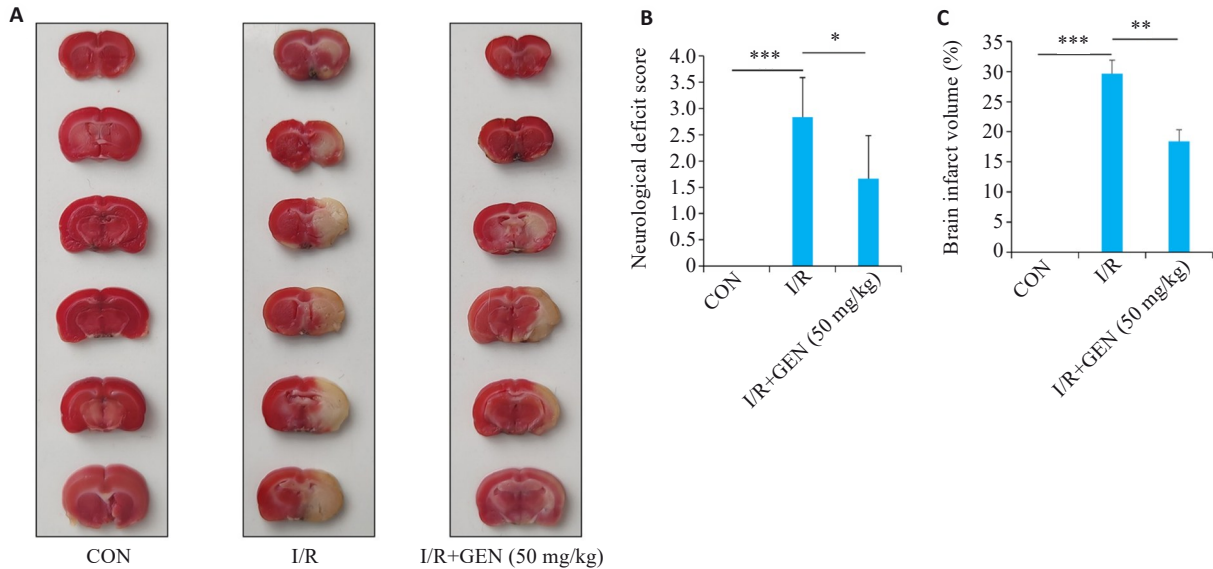


图4 脑梗死体积的变化以及神经功能评分

Fig.4 Cerebral infarction volume and neurological deficit score of rats in different groups. A: TTC staining of brain tissue in each group. B: Neurological deficit score ($n=6$). C: Cerebral infarction volume ($n=6$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

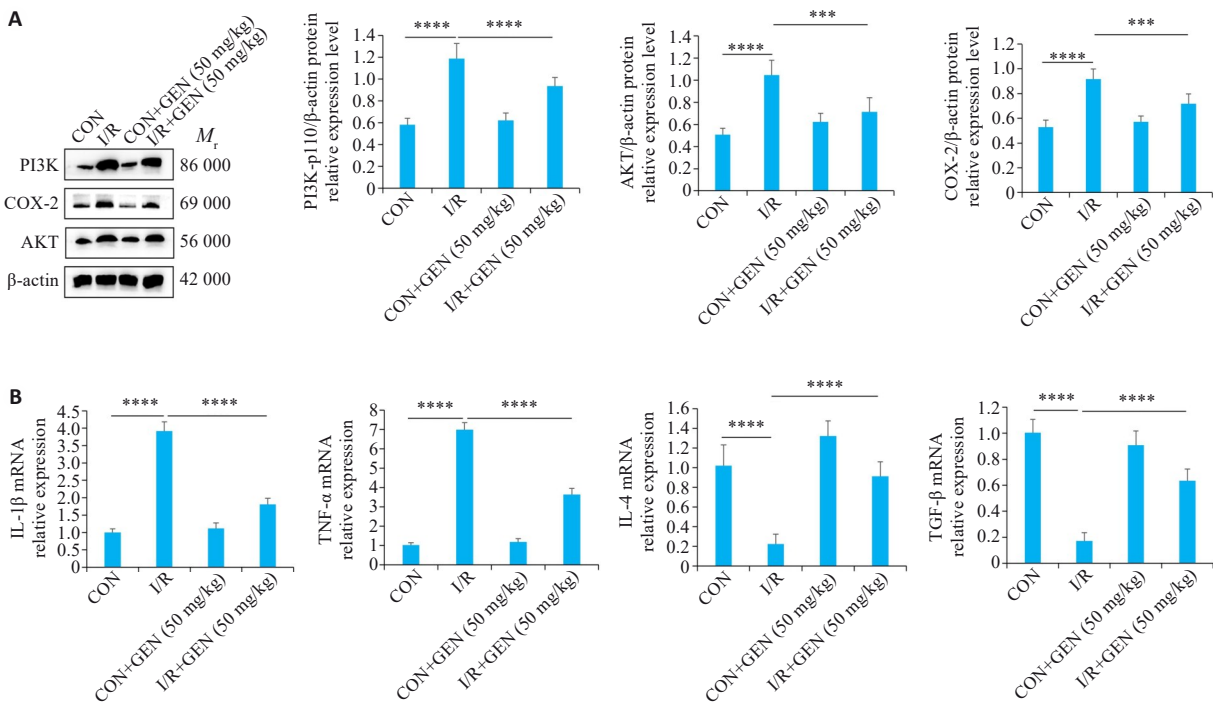


图5 GEN抑制PI3K/AKT/COX-2信号通路减轻神经炎症

Fig.5 Inhibition of the PI3K/AKT/COX-2 signaling pathway by GEN alleviates neuroinflammation in rats with cerebral I/R injury. A: Analysis of expression levels of PI3K, AKT, and COX-2 proteins in each groups by Western blotting ($n=6$). B: Detection of mRNA levels of IL-1β, TNF-α, IL-4, and TGF-β by RT-qPCR ($n=6$). *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

(0.1%)处理组与空白对照组相比,经过5 $\mu\text{mol/L}$ 药物 GEN处理24 h后,细胞活力无显著性差异($P>0.05$),表明该浓度药物对于实验细胞无显著性毒性,不影响后续实验解读。经10、15、20、25、30 $\mu\text{mol/L}$ 药物 GEN处理24 h后,BV2的细胞活力下降($P<0.01$),故选用药物浓度为5 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续实验给药浓度(图8)。

2.9 GEN对OGD/R模型BV2蛋白标记物CD86、CD206表达的影响

Western blotting分析结果显示:与对照组相比,OGD/R组的BV2细胞CD86的蛋白表达上调($P<0.001$),CD206的蛋白表达下调($P<0.05$);与OGD/R组比较,OGD/R+GEN组的CD86表达下调($P<0.01$),

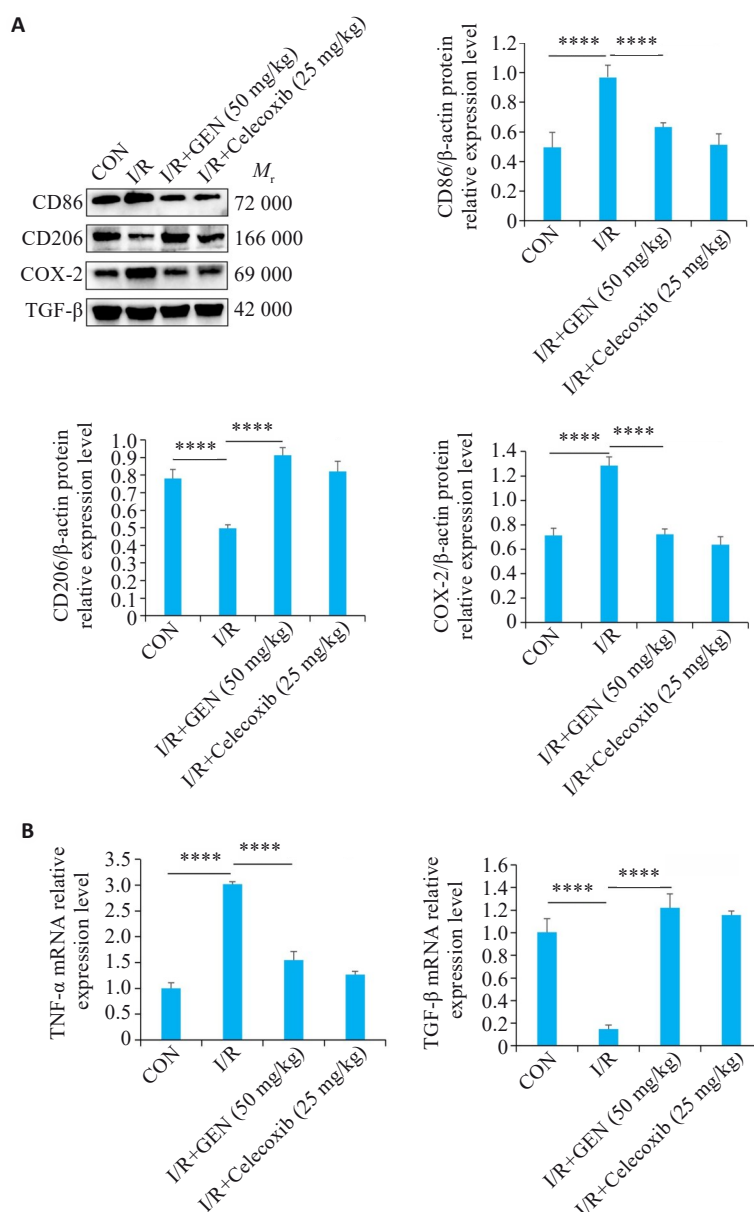


图6 GEN通过PI3K/AKT/COX-2信号通路调控小胶质细胞的极化

Fig.6 GEN regulates polarization of microglia through the PI3K/AKT/COX-2 signaling pathway. A: Expression levels of CD86, CD206 and COX-2 proteins in the brain tissues of rats in each group detected by Western blotting ($n=6$). B: RT-qPCR for detecting mRNA expression levels of TNF- α and TGF- β ($n=6$). **** $P<0.0001$.

CD206表达上调($P<0.01$,图9A)。免疫荧光染色结果显示:与OGD/R组相比,OGD/R+GEN组的CD86表达下降($P<0.05$),CD206表达上升($P<0.01$,图10A、B)。

2.10 GEN对OGD/R模型的BV2炎症因子分泌水平的影响

RT-qPCR检测结果显示:与对照组相比,OGD/R组IL-1 β ($P<0.001$)、IL-6 ($P<0.01$) mRNA表达均明显升高,IL-4、IL-10 mRNA表达均降低($P<0.05$);与OGD/R组相比,OGD/R+GEN组的IL-1 β 、IL-6 mRNA表达均下降($P<0.05$),IL-4、IL-10均增加($P<0.001$,图9B)。ELISA检测显示:与对照组相比,OGD/R组的IL-1 β mRNA表达水平上升($P<0.001$),IL-4 mRNA表达水平

下降($P<0.01$);与OGD/R组比,OGD/R+GEN组的IL-1 β mRNA表达水平下降($P<0.01$),IL-4 mRNA表达水平上升($P<0.0001$,图9C)。

2.11 GEN对PI3K/AKT/COX-2通路及BV2极化状态的影响——基于PI3K敲低模型

Western blotting分析显示,与阴性对照组(si-NC)相比,si-PI3K1、si-PI3K2及si-PI3K3均能降低PI3K蛋白表达水平(分别 $P<0.0001$ 、 $P<0.05$ 、 $P<0.001$)。RT-qPCR结果进一步证实,3种siRNA均显著抑制PI3K mRNA表达($P<0.0001$,图11A)。综合蛋白与mRNA水平的检测结果,确定si-PI3K1的敲低效率最优,故后续实验选用si-PI3K1进行PI3K功能缺失研究。通过

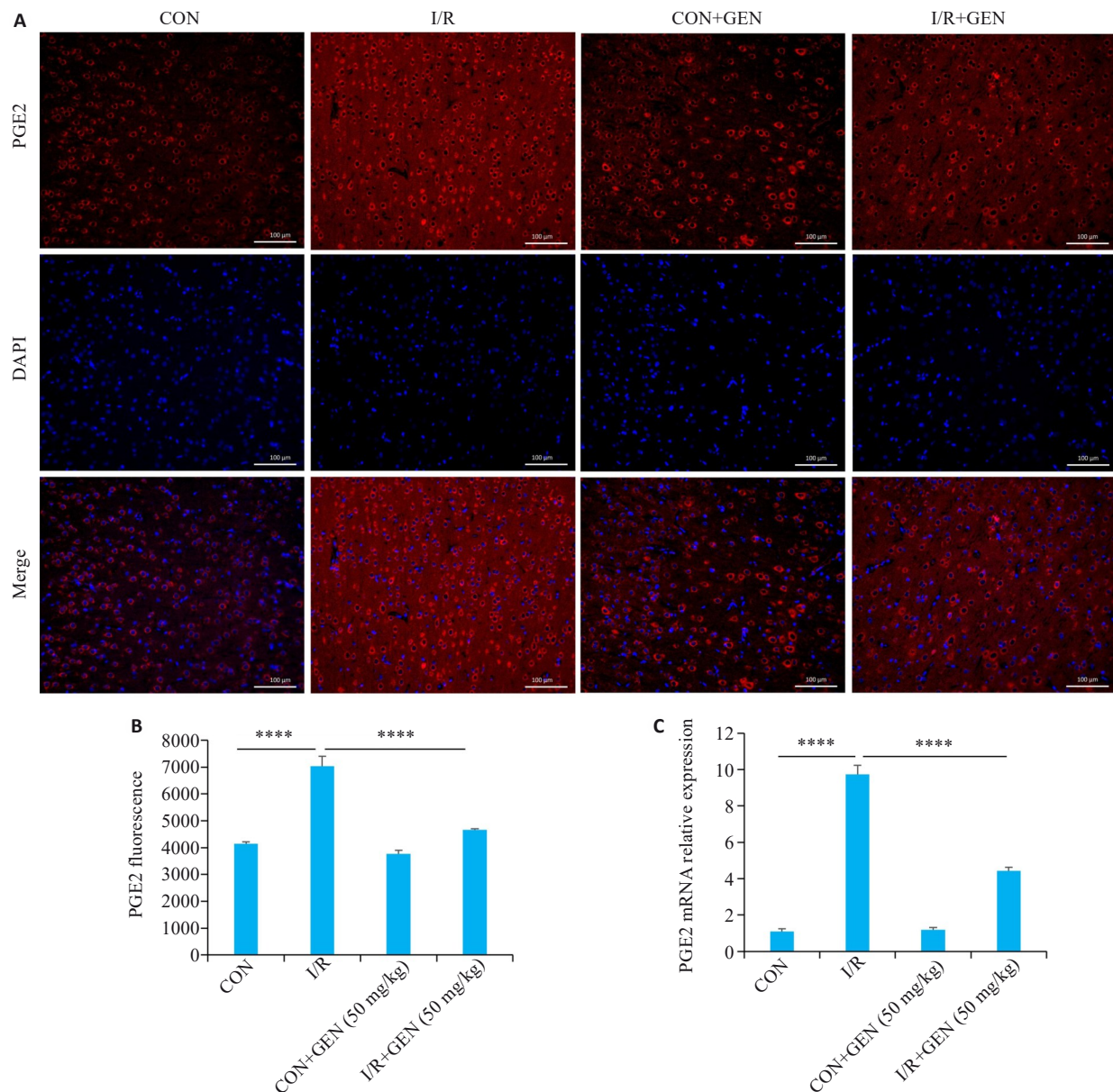


图7 各组大鼠脑组织中前列腺素的表达水平

Fig.7 Levels of PGE2 in brain tissues of rats in each group detected by immunofluorescence staining. **A**: Immunofluorescence staining for PGE2 in each group ($\times 200$). **B**: Quantitative analysis of PGE2 expression level in the brain tissues of the rats. **C**: Expression levels of PGE2 mRNA ($n=6$). **** $P<0.0001$.

Western blotting 技术检测对照组、OGD/R 组、OGD/R+GEN 组、si-PI3K+OGD/R 组、si-PI3K+OGD/R+GEN 组 BV2 极化标志物及 PI3K/AKT/COX-2 通路关键蛋白的表达变化。极化标志物的表达变化:与对照组相比,OGD/R 组 CD86 表达上调($P<0.001$),CD206 表达下调($P<0.01$);与 OGD/R 组比较,OGD/R+GEN 组、si-PI3K+OGD/R 组及 si-PI3K+OGD/R+GEN 组 CD86 表达均下调($P<0.05$),CD206 表达均上调($P<0.01$,图 11B)。通路蛋白表达变化对照组比较,OGD/R 组 p-PI3K($P<0.001$)、p-AKT($P<0.01$)、COX-2($P<0.001$)表达上调;与 OGD/R 组比较,OGD/R+GEN 组、si-PI3K+OGD/R 组及 si-PI3K+OGD/R+GEN 组 p-PI3K($P<0.05$,图 11C)、p-AKT($P<0.05$,图 11D)、COX-2($P<0.05$,

图 11E)表达均下调。

RT-qPCR 检测各组 mRNA 水平,结果显示,与对照组比较,OGD/R 组 IL-1 β 、PI3K、AKT、COX-2 均显著上调($P<0.001$),IL-4 下调($P<0.05$,图 11F);与 OGD/R 组比较,OGD/R+GEN 组、si-PI3K+OGD/R 组及 si-PI3K+OGD/R+GEN 组 IL-1 β ($P<0.01$)、PI3K($P<0.05$)、AKT、COX-2 下调($P<0.01$),IL-4 上调($P<0.001$,图 11F)。

2.12 GEN 对 PI3K/AKT/COX-2 通路及 BV2 极化状态的影响——基于激动剂 740Y-P 增强 PI3K 活性

极化标志物的表达变化:与对照组相比,OGD/R 组 CD86 表达上调($P<0.001$),CD206 表达下调($P<0.01$)。与 OGD/R 组比较,OGD/R+GEN 组、740Y-P+OGD/R+GEN 组 CD86 表达下调($P<0.01$ 、 $P<0.05$),740Y-P+

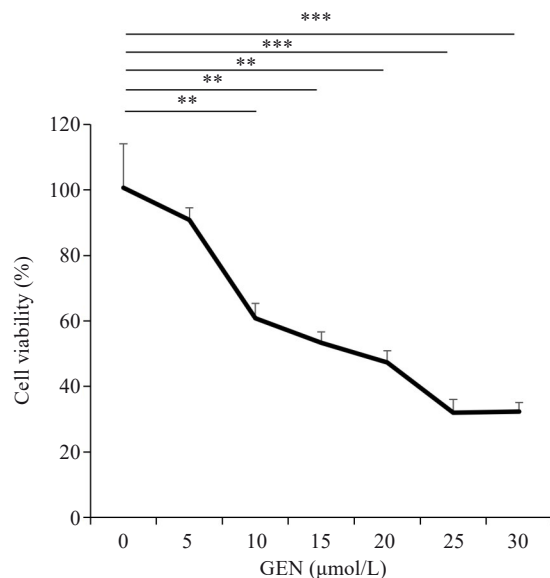


图8 检测不同浓度的GEN对BV2的毒性作用

Fig.8 Detection of cytotoxic effects of different concentrations of genistein on microglia. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

OGD/R组CD86表达差异无统计学意义($P > 0.05$); OGD/R+GEN组、740Y-P+OGD/R+GEN组CD206表达上调($P < 0.001$ 、 $P < 0.05$), 740Y-P+OGD/R组CD206表达差异无统计学意义($P > 0.05$,图12A)。信号通路蛋白的表达:与对照组相比,OGD/R组p-PI3K、p-AKT、COX-2表达上调($P < 0.001$);与OGD/R组比较,OGD/R+GEN组、740Y-P+OGD/R+GEN组p-PI3K、p-AKT、COX-2均表达下调($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$), 740Y-P+OGD/R组p-PI3K、p-AKT、COX-2表达差异无统计学意义($P > 0.05$,图12B~D)。RT-qPCR检测各组mRNA表达水平,结果显示,对照组相比,OGD/R组IL-1 β 、PI3K、AKT、COX-2均表达上调($P < 0.001$,图12E),IL-4表达下调($P < 0.05$,图12E)。与OGD/R组比较,OGD/R+GEN组、740Y-P+OGD/R+GEN组较OGD/R组表达IL-1 β ($P < 0.01$)、PI3K($P < 0.05$)、AKT($P < 0.01$)、COX-2($P < 0.05$)均下调(图12E),IL-4表达显著上调(分别 $P < 0.001$ 、 $P < 0.05$), 740Y-P+OGD/R组IL-1 β 、PI3K、AKT、COX-2、IL-4表达差异性无统计学意义($P > 0.05$,图12E)。

2.13 GEN对BV2与小鼠皮质神经元的共培养体系神经元凋亡的影响

与对照组相比,OGD/R组细胞凋亡率上调($P < 0.001$),与OGD/R组比较,OGD/R+GEN组神经元凋亡率下调($P < 0.01$,图13)。

2.14 GEN对BV2-HT22共培养体系相关凋亡蛋白的影响

Western blotting结果显示,相较于对照组,OGD/R组Cleaved Caspase-3($P < 0.001$)、Bax($P < 0.01$)蛋白及Bax/Bcl-2比值($P < 0.001$)升高,Bcl-2表达则降低($P < 0.001$);而OGD/R+GEN组相较OGD/R组,Cleaved

Caspase-3($P < 0.01$)、Bax($P < 0.01$)及Bax/Bcl-2比值($P < 0.001$)均降低。Bcl-2表达上调($P < 0.05$,图14A、B)。RT-qPCR结果显示,相较于对照组,OGD/R组Caspase-3、Bax mRNA表达升高($P < 0.001$),Bcl-2表达降低($P < 0.001$,图14C);而OGD/R+GEN组相较OGD/R组,Caspase-3($P < 0.01$)、Bax($P < 0.001$)表达下调,Bcl-2上调($P < 0.05$),同时BDNF表达在OGD/R组中较对照组降低($P < 0.001$),经干预后回升($P < 0.05$,图14C)。CCK8检测HT22活力,与对照组相比,OGD/R组细胞活力下降($P < 0.001$),OGD/R+GEN组较OGD/R组活力上调($P < 0.01$,图14D)。

3 讨论

脑缺血/再灌注损伤是一种复杂的病理过程,其发生发展涉及钙离子超载、过量氧自由基产生以及炎症反应的过度激活^[18]。其中,神经炎症反应被认为是推动组织损伤持续扩大的关键驱动力,小胶质细胞在中枢神经系统发育、稳态维持及脑损伤后的炎症反应中扮演核心调控角色^[19]。小胶质细胞具有两种极化表型:促炎的M1型和抗炎修复的M2型,这两种表型在功能上、分子标记和病理作用上会存在显著的差异^[8],M1型小胶质细胞表面受体主要为CD86、CD16/32、MHC-2等,M2型小胶质细胞表面受体主要为CD206、Arg1、CD163等,经典激活的M1型小胶质细胞可分泌TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等促炎介质及活性氧簇(ROS),显著加剧神经元损伤;而替代激活的M2型小胶质细胞则通过释放IL-10、TGF- β 等抗炎介质,发挥神经保护和组织修复功能^[20-22]。小胶质细胞在脑缺血过程中可迅速激活,通过动态调控炎症应答,对缺血性脑损伤与神经修复具有双重影响^[19]。

GEN通过清除自由基并抑制炎症因子产生发挥抗氧化、抗炎的功效^[23]。本课题组前期研究表明,大豆异黄酮(主要成份为GEN)通过抑制炎症级联反应减轻大鼠脑缺血/再灌注损伤^[24]。本研究也系统性的论证了GEN是否能调控(再灌注后小胶质细胞的极化表型纠正缺血/再灌注诱导的极化状态失衡进而减轻脑缺血/再灌注诱导的神经炎症损伤。本研究采用多维度评估GEN预处理对脑缺血/再灌注后小胶质细胞极化状态的影响。小胶质细胞极化失衡是脑缺血继发性炎症损伤的重要驱动因素,多种天然活性分子可通过调节炎症信号改善细胞表型^[25, 26]。本研究结果与上述研究在“抑制促炎、促进抗炎”的总体方向上具有一致性,但进一步在缺血/复氧双模型体系中验证了GEN对极化标志物与炎症因子表达的协同调控,强调了其在急性炎症微环境中的潜在作用特点。与部分仅基于单一模型或单指标观察的研究相比,本研究通过多指标联合评估,为理解GEN介导的小胶质细胞状态调节提供了更为系统的实验支持。实验结果证明GEN能有效促进小胶质细胞由促炎

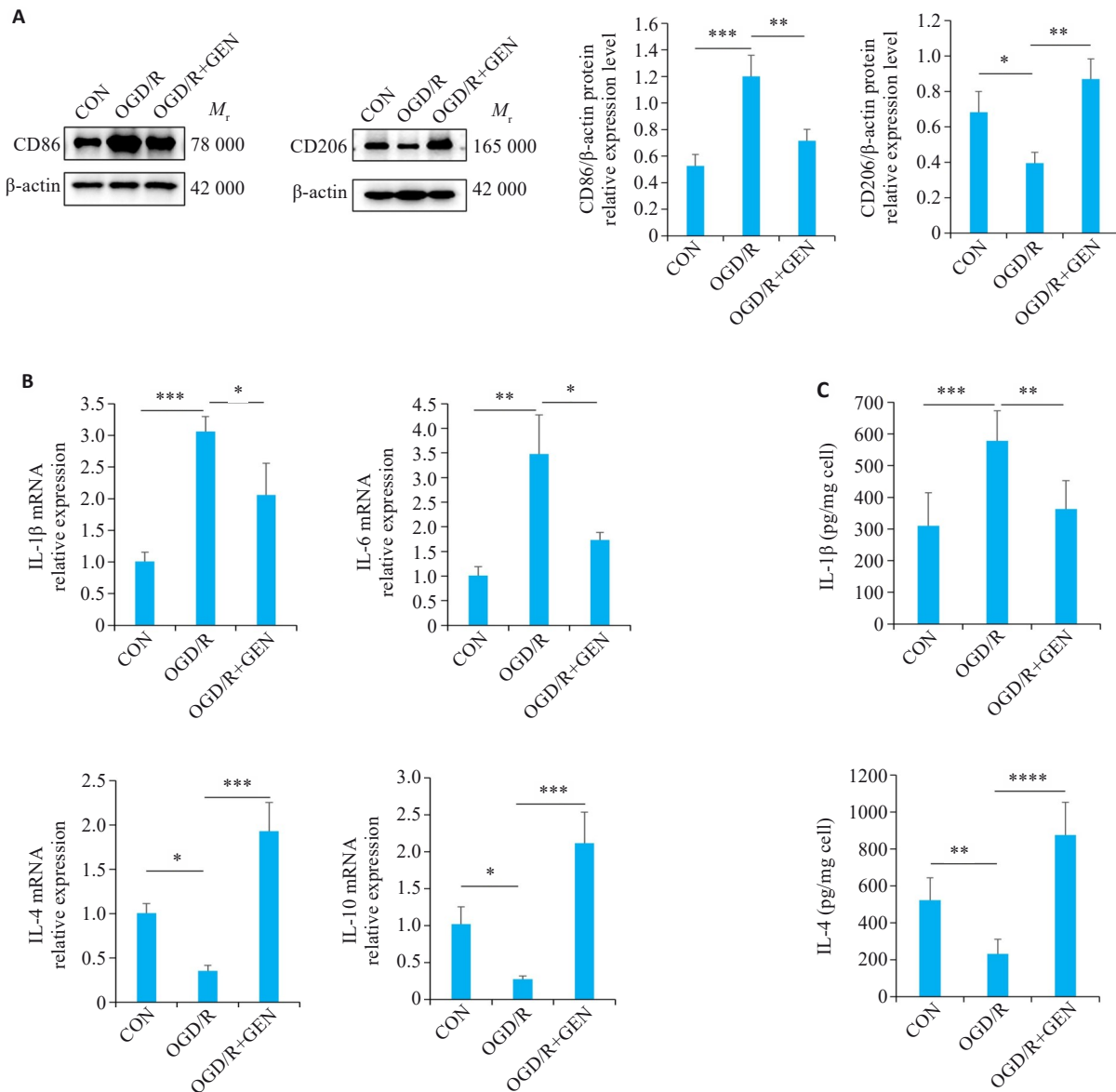


图9 GEN处理调控OGD/R诱导的BV2细胞极化状态

Fig.9 GEN regulates polarization of BV2 cells induced by OGD/R. A: Western blotting of CD86 and CD206 proteins in the microglia in different groups ($n=3$). B: RT-qPCR for detecting IL-1 β , IL-6, IL-4, and IL-10 mRNA levels ($n=3$). C: Secreted levels of IL-1 β and IL-4 in BV2 cell supernatants quantified by ELISA ($n=6$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

M1型向抗炎M2型转化,显著抑制促炎因子并增强抗炎因子产生,从而减轻脑缺血/再灌注诱导的神经炎症反应。值得注意的是,本研究在体实验采用大鼠脑缺血模型,而离体实验使用小鼠来源BV2细胞系。这种跨种属实验设计在神经炎症研究中较为常见,其核心目的在于分别利用动物模型的整体病理再现能力与细胞模型的机制解析优势。BV2细胞在炎症反应和极化标志表达方面具有高度保守性,因此种属差异并不影响信号通路的基本调控规律^[27, 28]。本研究在体与离体实验结果呈一致趋势,增强了结论的可靠性。

PI3K/AKT活化可通过NF- κ B等转录因子上调COX-2表达并促进PGE2释放,从而推动促炎反应与小胶质细胞M1型极化,加重神经损伤^[29-31]。本研究观察

到GEN干预可同步抑制该信号轴并诱导小胶质细胞向抗炎表型转化,这一趋势与现有天然活性分子调控炎症信号的研究结果总体一致。但与多数仅在单一模型或单信号节点验证的研究相比,本研究通过体内外双模型及上下游分层干预设计,进一步强化了PI3K/AKT/COX-2轴在小胶质细胞极化与神经炎症中的因果关联,为该通路在缺血/再灌注背景下的调控机制提供了更系统的实验支持。

PI3K/AKT/COX-2通路在细胞增殖、凋亡及炎症调控中发挥核心作用^[32, 33]。PI3K作为信号枢纽,通过激活AKT,将外界信号传导至胞内;COX-2作为关键下游效应分子,催化前列腺素合成,连接生存信号与炎症、肿瘤微环境。该通路异常激活常见于胃癌、结直肠癌及肺

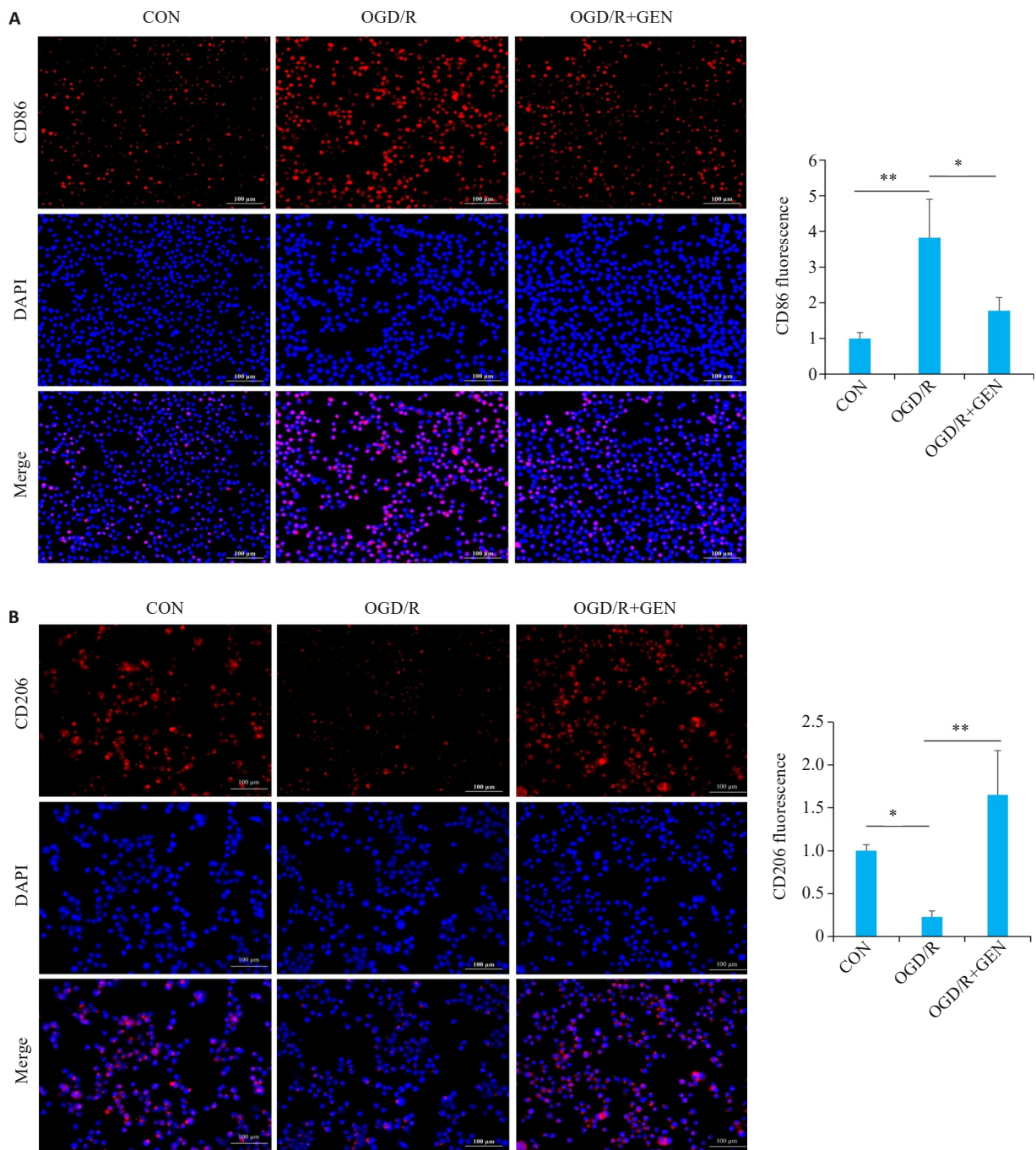


图10 各组BV2细胞CD86和CD206的水平。
Fig. 10 Levels of CD86 and CD206 in BV2 cells in each group. A: Immunofluorescence staining and quantitative analysis of CD86 in each group ($\times 200$; $n=3$). B: Immunofluorescence imaging and quantitative analysis of CD206 in each group ($\times 200$; $n=3$).
* $P<0.05$, ** $P<0.01$.

腺癌等肿瘤^[34-36],表现为PTEN失活、PIK3CA突变^[37]及COX-2过表达,驱动癌细胞增殖、侵袭及治疗抵抗,形成PI3K/AKT与COX-2的正反馈循环,加剧恶性进程^[38]。在神经炎症中,该通路呈现双重作用:一方面,PI3K/AKT激活促进COX-2表达及PGE2释放,放大炎症反应;另一方面,其活化抑制小胶质细胞向抗炎M2型转化,加剧神经损伤^[39, 40]。机制上,PI3K/AKT通过NF- κ B等转录因子上调COX-2,而COX-2产物反馈激活通路,形成促炎级联^[41]。因此,PI3K/AKT/COX-2/PGE2信号

轴被认为是调控免疫微环境平衡的核心机制,靶向该通路(如抑制COX-2或阻断PI3K/AKT)有望重塑免疫微环境,重塑小胶质细胞的功能状态,促使其向神经保护与修复的M2表型偏移,从而缓解脑缺血/再灌注的病理损伤,为脑缺血等神经炎症疾病提供治疗策略^[41, 42]。
为明确GEN是否对脑缺血/再灌注后小胶质细胞PI3K/AKT/COX-2信号通路的影响,本研究实验结果表明GEN能抑制炎症调控信号轴PI3K/AKT/COX-2信号通路活性,抑制缺血/再灌注后神经炎症级联放大

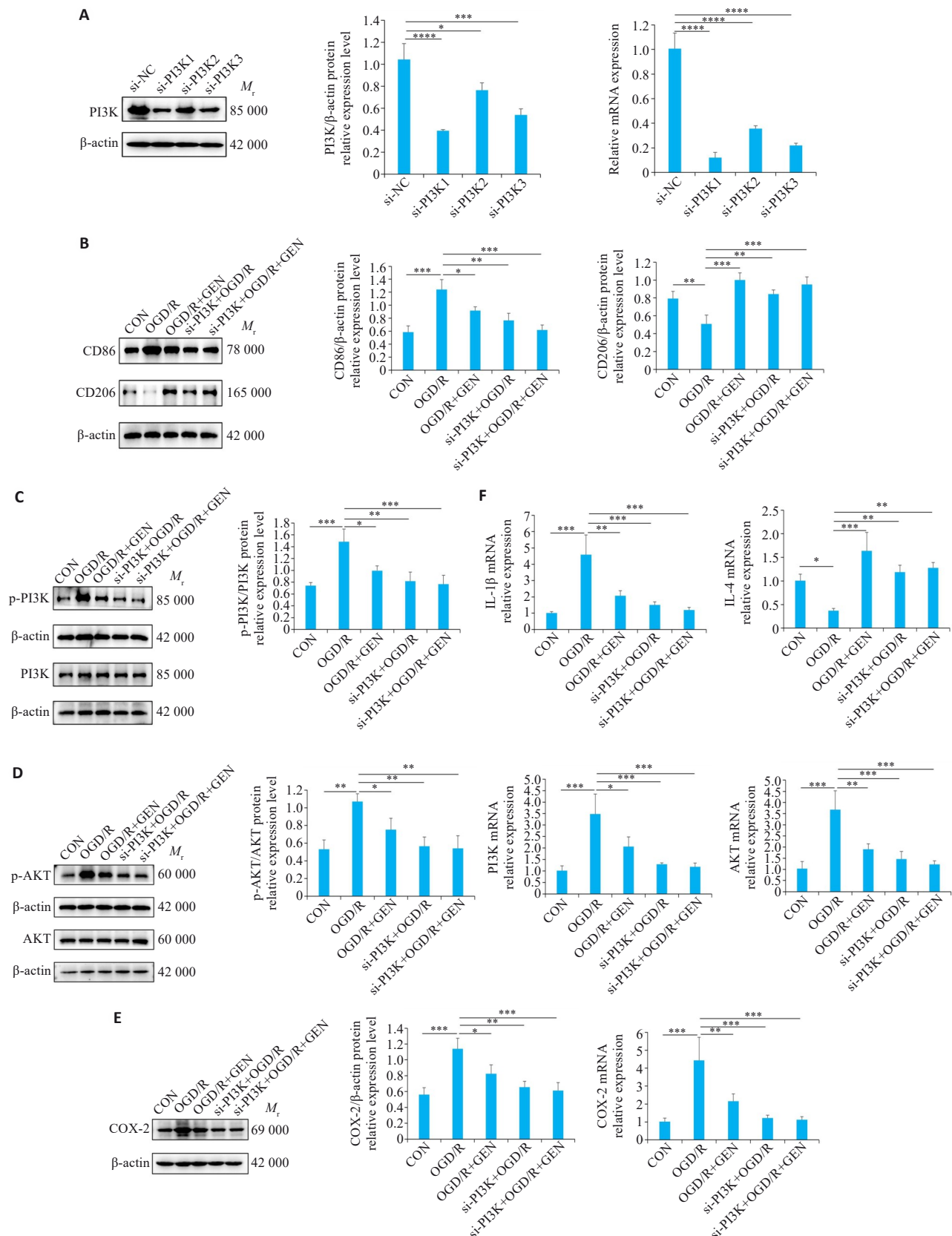


图11 GEN经PI3K/AKT/COX-2信号轴调控小胶质细胞极化的机制验证

Fig.11 Verification of the role of the PI3K/AKT/COX-2 signaling pathway in mediating the regulatory effect of GEN on microglial polarization. A: Western blotting and RT-qPCR for verifying silencing efficiency of si-PI3K1/2/3 ($n=3$). B: Western blotting for detecting CD86 and CD206 protein expression in the microglia in different treatment groups ($n=3$). C: Western blotting for detecting phosphorylation levels of p-PI3K in the microglia in different groups ($n=3$). D: Western blotting of p-AKT protein in the microglia in different treatment groups ($n=3$). E: Western blotting analysis of COX-2 protein in the microglia in different treatment groups ($n=3$). F: Results of RT-qPCR for detecting mRNA expressions of inflammatory cytokines and PI3K/AKT/COX-2 pathway in the microglia ($n=3$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

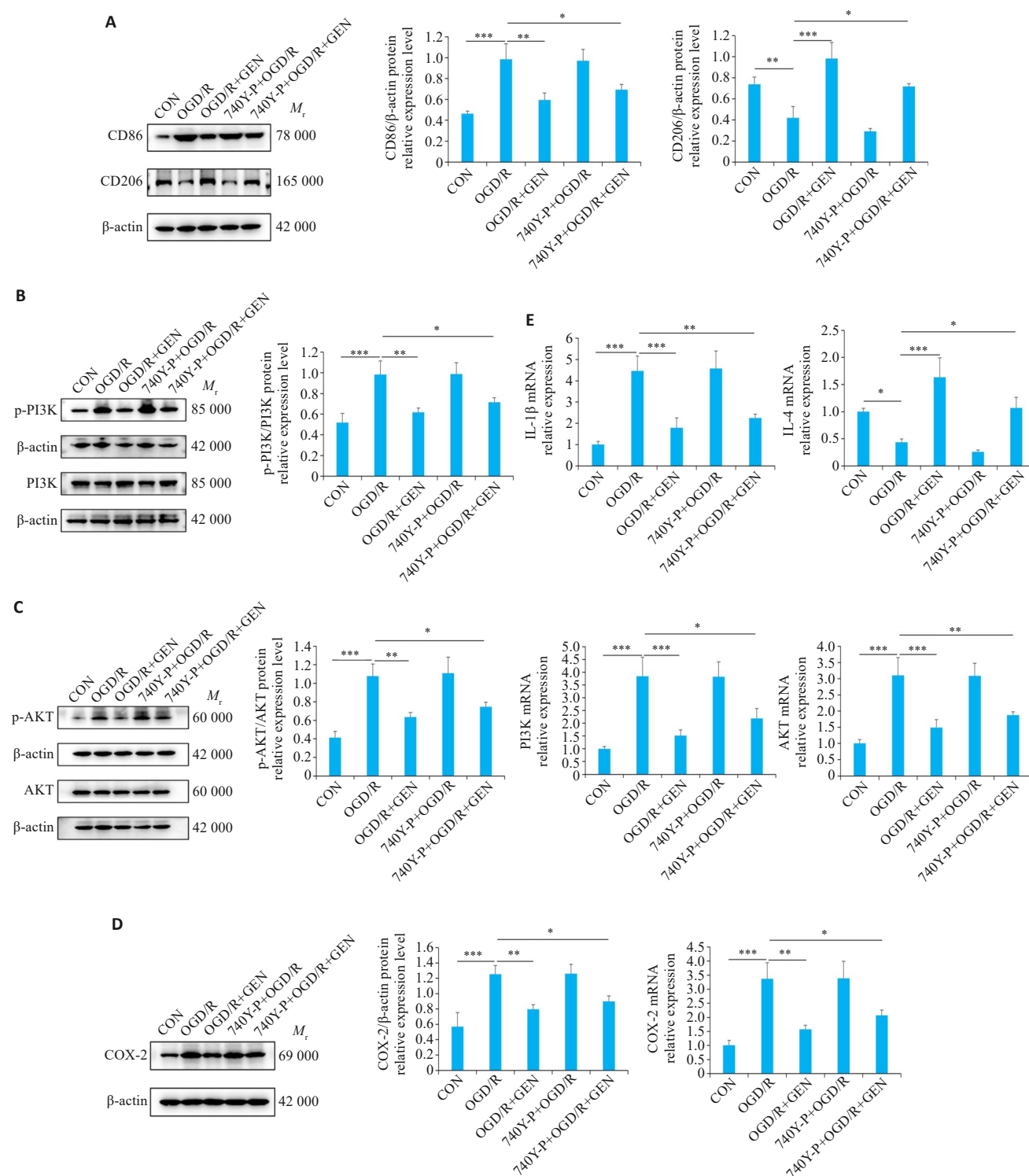


图12 GEN依赖PI3K/AKT/COX-2信号轴促进BV2向M2极化:PI3K激动剂的协同效应

Fig. 12 GEN-dependent PI3K/AKT/COX-2 signaling axis enhances M2 polarization in microglia: the synergistic effects of PI3K agonists. **A**: Western blotting of CD86 and CD206 proteins in the microglia in different groups ($n=3$). **B**: Western blotting of p-PI3K/PI3K proteins in the microglia in different groups ($n=3$). **C**: Western blotting of p-AKT/AKT protein in the microglia in different groups ($n=3$). **D**: Western blotting of COX-2 protein in the microglia in different groups ($n=3$). **E**: RT-qPCR for detecting mRNA expressions of inflammatory cytokines and PI3K/AKT/COX-2 pathway in the microglia in different groups ($n=3$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

反应。为进一步明确GEN是否通过PI3K/AKT/COX-2信号通路调控小胶质细胞极化,本研究通过在体实验证实GEN通过抑制PI3K/AKT/COX-2信号通路抑制神经炎症,且Celecoxib组和Gen组均能上调CD206的表

达水平,下调CD86的表达水平,降低促炎因子TNF- α 在基因水平的表达,增加抑炎因子TGF- β 在基因水平的表达。随后通过离体实验,采用siRNA敲低PI3K表达和增强PI3K活性两种方式检测小胶质细胞极化状态的

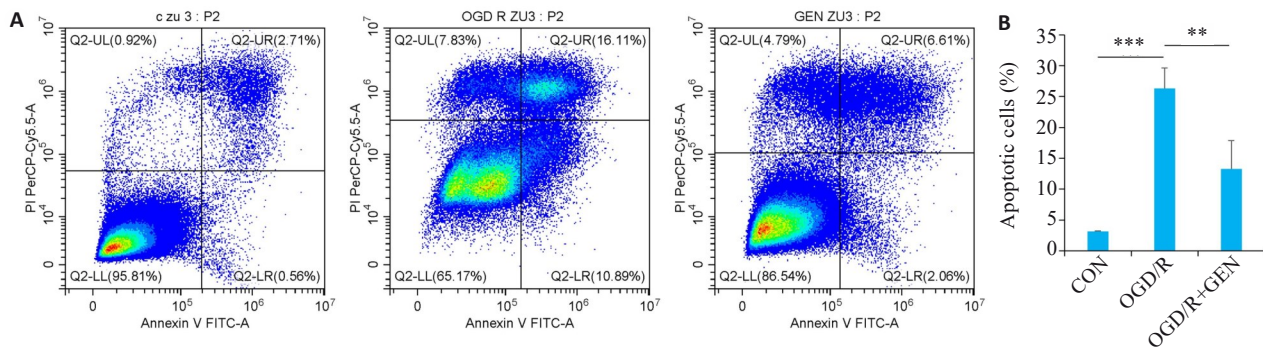


图 13 Annexin V-FITC/PI双染法评估共培养体系细胞凋亡状态

Fig.13 Cell apoptosis of the co-cultured cells assessed by Annexin V-FITC/PI double staining. A: Annexin V-FITC/PI dual staining flow cytometry for detecting cell apoptosis in each group. B: Statistical analysis of cell apoptosis rates in each group ($n=3$).

** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

变化。实验结果证明,GEN可通过抑制PI3K/AKT/COX-2通路调控小胶质细胞极化状态,抑制脑缺血/再灌注诱导的神经炎症反应。本实验中在体实验选用COX-2抑制策略,而离体实验重点干预PI3K,是基于信号级联结构的分层验证设计。COX-2作为PI3K/AKT下游炎症效应分子,更适合在整体动物水平观察炎症终端效应;而PI3K位于信号起始节点,更适用于细胞层面的因果机制干预。这种“上游一下游”双层验证有助于从不同层级确认信号轴在炎症调控中的关键地位^[43]。在蛋白检测策略方面,细胞实验重点检测磷酸化形式蛋白,以反映信号通路的瞬时活化状态;动物实验则以总蛋白表达为主,更侧重长期病理变化的累积结果。考虑到在体组织中磷酸化蛋白稳定性较差、取样时间差异可能影响检测一致性,我们认为采用总蛋白指标可提高数据重复性。

小胶质细胞在OGD/R后通过释放炎症因子和神经营养因子,显著调控神经元凋亡过程^[44-46]。为验证GEN是否通过调控BV2极化减轻神经元损伤,本研究构建BV2与神经元共培养体系证实,在OGD/R模型中,GEN显著降低神经元凋亡率,逆转促凋亡蛋白(Cleaved Caspase-3/Bax)上调和抗凋亡蛋白(Bcl-2)下调,增强BDNF表达并改善细胞活力。这一效果与已有研究中天然活性分子改善神经元生存、增强神经营养支持的报道相一致,进一步表明通过调节小胶质细胞状态改善神经元结局是天然化合物抗炎神经保护作用的重要机制^[47]。相比之下,部分以单一神经元模型评估化合物保护效应的研究虽然也观察到神经元存活的改善,但未从免疫细胞—神经元互作角度揭示氛围调控机制。本研究通过共培养体系强调了小胶质细胞炎症极化状态与神经元命运之间的功能联系,补充了现有机理解析的深度,为理解GEN在神经炎症微环境中的保护作用提供了更全面的实验支持。

本研究虽然证实了GEN通过PI3K/AKT/COX-2通路调控BV2极化并发挥神经保护作用,但仍存在一

定局限性。首先,体内外模型采用不同来源的细胞体系,尽管在炎症反应趋势及小胶质细胞极化方向上呈现一致结果,但跨种属实验设计及永生细胞模型固有的生物学差异仍可能对结果的外推性产生影响。BV2细胞在炎症敏感性、代谢状态及信号响应方面与原代小胶质细胞存在一定差异,因此当前结论更多反映机制相关性,而非完全等同于体内真实病理状态。未来研究可结合原代小胶质细胞或同源动物模型进行验证,以增强研究结果的生理相关性与转化可靠性。其次,本研究重点关注GEN干预在特定时间窗口内的抗炎与极化调节作用,而剂量—时间依赖关系尚未进行系统建立。炎症信号具有明显的动态变化特征,不同剂量或干预时程可能影响信号调控强度及细胞响应模式,因此现有结果仍不足以全面界定GEN的药效窗口与持续作用特性。后续研究可通过多剂量梯度与时间序列分析,进一步明确其作用阈值及调控节律,从而提升药理学解释的完整性。此外,本研究对下游炎症效应分子的分析主要集中于表达水平变化,尚缺乏更直接的功能性验证。炎症调控往往涉及多通路交互及反馈调节,仅依赖表达指标难以完全揭示其功能贡献。未来可通过功能阻断实验、信号追踪或多节点干预策略,进一步确认关键效应分子在GEN调控过程中的实际作用,以深化对相关机制的理解。

综上所述,本研究系统论证了GEN通过PI3K/AKT/COX-2通路调控小胶质细胞向M2型极化,抑制炎症与凋亡,调节Caspase-3/Bax/Bcl-2及BDNF表达,减轻神经元损伤。本研究在缺血/复氧双模型体系中验证了GEN对极化标志物与炎症因子表达的协同调控;通过体内外分层干预设计,强化了PI3K/AKT/COX-2轴与小胶质细胞极化之间的因果关联;借助共培养体系揭示了GEN通过调控小胶质细胞状态间接发挥神经保护作用的机制路径。本研究为理解GEN在缺血性脑损伤中的抗炎机制提供了更为系统的实验支持,也为靶向小胶质细胞极化治疗脑缺血/再灌注损伤提供了新的干预策略与理论依据。

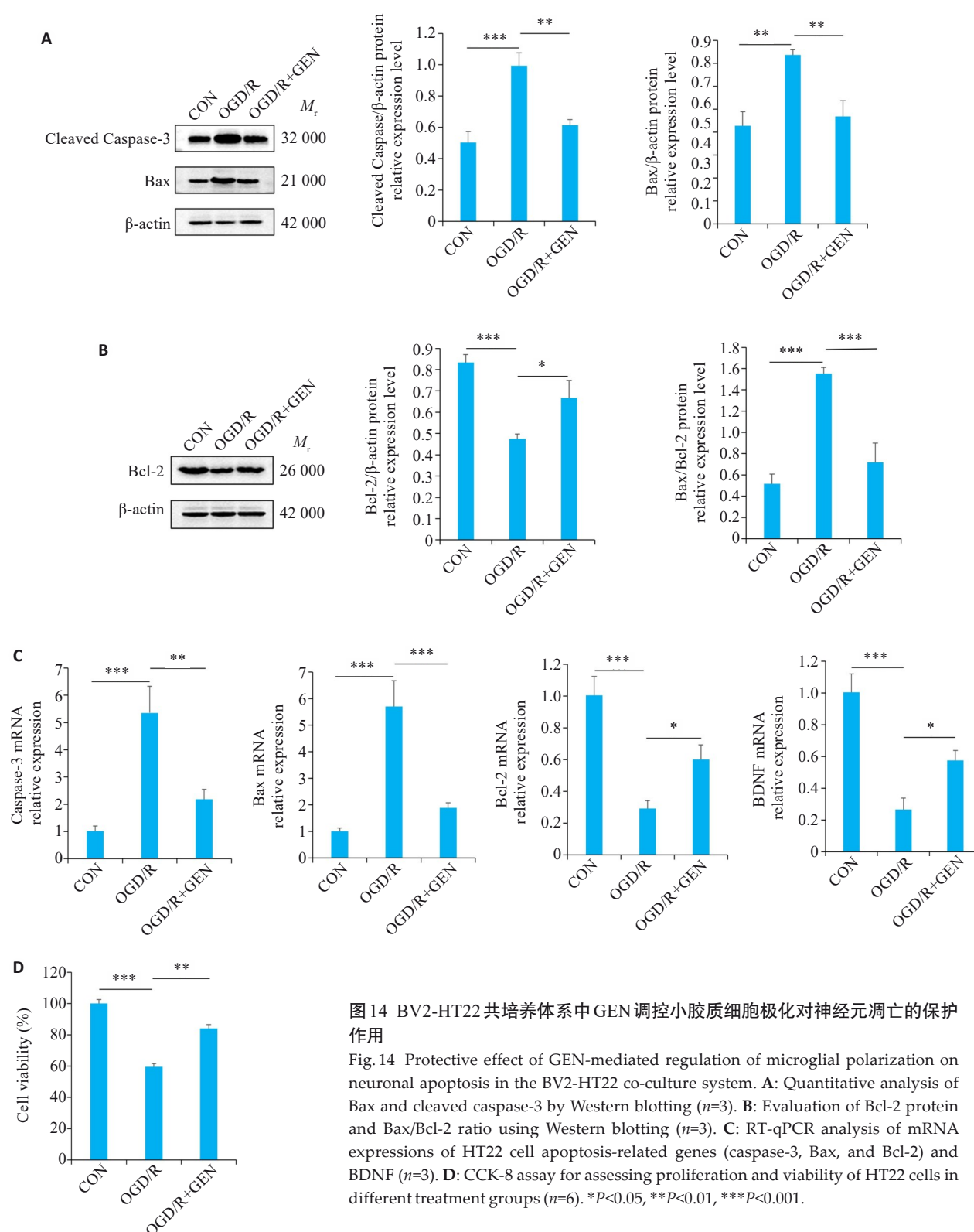


图 14 BV2-HT22 共培养体系中 GEN 调控小胶质细胞极化对神经元凋亡的保护作用

Fig. 14 Protective effect of GEN-mediated regulation of microglial polarization on neuronal apoptosis in the BV2-HT22 co-culture system. **A**: Quantitative analysis of Bax and cleaved caspase-3 by Western blotting ($n=3$). **B**: Evaluation of Bcl-2 protein and Bax/Bcl-2 ratio using Western blotting ($n=3$). **C**: RT-qPCR analysis of mRNA expressions of HT22 cell apoptosis-related genes (caspase-3, Bax, and Bcl-2) and BDNF ($n=3$). **D**: CCK-8 assay for assessing proliferation and viability of HT22 cells in different treatment groups ($n=6$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Feske SK. Ischemic stroke[J]. Am J Med, 2021, 134(12): 1457-64.
- [2] Tuo QZ, Zhang ST, Lei P. Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications[J]. Med Res Rev, 2022, 42(1): 259-305.
- [3] Su ZZ, Ye YZ, Shen CG, et al. Pathophysiology of ischemic stroke: noncoding RNA role in oxidative stress[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 5815843.
- [4] DeLong JH, Ohashi SN, O'Connor KC, et al. Inflammatory responses after ischemic stroke[J]. Semin Immunopathol, 2022, 44(5): 625-48.
- [5] Lei W, Zhuang H, Huang WY, et al. Neuroinflammation and energy metabolism: a dual perspective on ischemic stroke[J]. J Transl Med,

- 2025, 23(1): 413.
- [6] Fan PL, Wang SS, Chu SF, et al. Time-dependent dual effect of microglia in ischemic stroke[J]. *Neurochem Int*, 2023, 169: 105584.
 - [7] Qiu YM, Zhang CL, Chen AQ, et al. Immune cells in the BBB disruption after acute ischemic stroke: targets for immune therapy? [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 678744.
 - [8] Xu SB, Lu JN, Shao AW, et al. Glial cells: role of the immune response in ischemic stroke[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 294.
 - [9] Yu T, Wang P, Wu YX, et al. miR-26a reduces inflammatory responses *via* inhibition of PGE2 production by targeting COX-2 [J]. *Inflammation*, 2022, 45(4): 1484-95.
 - [10] Schlachetzki JC, Fiebich BL, Haake E, et al. Norepinephrine enhances the LPS-induced expression of COX-2 and secretion of PGE2 in primary rat microglia[J]. *J Neuroinflammation*, 2010, 7 (1): 2.
 - [11] Ding WH, Chen XY, Li W, et al. Genistein protects genioglossus myoblast against hypoxia-induced injury through PI3K-Akt and ERK MAPK pathways[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 5085.
 - [12] Li XY, Ding L, Li ZR, et al. Yangke powder alleviates OVA-induced allergic asthma by inhibiting the PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway[J]. *Chin Med*, 2025, 20(1): 69.
 - [13] Yoo MJ, Jang YJ, Park SY, et al. Synergistic anti-cancer effects of ERB-041 and genistein through estrogen receptor suppression-mediated PI3K/AKT pathway downregulation in canine mammary gland tumor cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(5): 2466.
 - [14] Kim BH, Cho JY. Anti-inflammatory effect of honokiol is mediated by PI3K/Akt pathway suppression[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29 (1): 113-22.
 - [15] Jayasooriya RGPT, Lee KT, Kang CH, et al. Isobutyrylshikonin inhibits lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E2 production in BV2 microglial cells by suppressing the PI3K/Akt-mediated nuclear transcription factor- κ B pathway[J]. *Nutr Res*, 2014, 34(12): 1111-9.
 - [16] Zhou JM, Gu SS, Mei WH, et al. Ginkgolides and bilobalide protect BV2 microglia cells against OGD/reoxygenation injury by inhibiting TLR2/4 signaling pathways[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2016, 21(6): 1037-53.
 - [17] Yu H, Xu ZH, Qu GJ, et al. Hypoxic preconditioning enhances the efficacy of mesenchymal stem cells-derived conditioned medium in switching microglia toward anti-inflammatory polarization in ischemia/reperfusion[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2021, 41(3): 505-24.
 - [18] Guo LZ, Tripathi H, Gao EH, et al. Autotaxin inhibition reduces post-ischemic myocardial inflammation *via* epigenetic gene modifications [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2024, 20(7): 1971-80.
 - [19] Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states[J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(4): 649-65.
 - [20] Wang ML, Pan W, Xu Y, et al. Microglia-mediated neuroinflammation: a potential target for the treatment of cardiovascular diseases[J]. *J Inflamm Res*, 2022, 15: 3083-94.
 - [21] Zhou HJ, Yan LL, Huang HZ, et al. Tat-NTS peptide protects neurons against cerebral ischemia-reperfusion injury *via* ANXA1 SUMOylation in microglia[J]. *Theranostics*, 2023, 13(15): 5561-83.
 - [22] Gong P, Jia HY, Li R, et al. Downregulation of Nogo-B ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury in mice through regulating microglia polarization *via* TLR4/NF- κ B pathway[J]. *Neurochem Int*, 2023, 167: 105553.
 - [23] Jaiswal KS, Malka O, Shauloff N, et al. Genistein carbon dots exhibit antioxidant and anti-inflammatory effects *in vitro*[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2023, 223: 113173.
 - [24] 李 晒, 李 丽, 闵思敏, 等. 大豆异黄酮可减轻大鼠脑缺血/再灌注损伤: 基于抑制铁死亡及炎症级联反应[J]. *南方医科大学学报*, 2023, 43(2): 323-31.
 - [25] Li L, Jiang WF, Yu BJ, et al. Quercetin improves cerebral ischemia/reperfusion injury by promoting microglia/macrophages M2 polarization *via* regulating PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 168: 115653.
 - [26] Zhao Q, Chen L, Zhang X, et al. β -elemene promotes microglial M2-like polarization against ischemic stroke *via* AKT/mTOR signaling axis-mediated autophagy[J]. *Chin Med*, 2024, 19(1): 86.
 - [27] Duan ZD, Chen HL, Miao W, et al. Scutellarin alleviates microglia-mediated neuroinflammation and apoptosis after ischemic stroke through the PI3K/AKT/GSK3 β signaling pathway[J]. *J Cell Commun Signal*, 2024, 18(2): e12023.
 - [28] Cui LL, Zhao SY, Liu H. SRSF3 alleviates ischemic cerebral infarction damage by activating the PI3K/AKT pathway[J]. *Dev Neurosci*, 2024, 46(5): 308-18.
 - [29] Chu E, Mychasiuk R, Hibbs ML, et al. Dysregulated phosphoinositide 3-kinase signaling in microglia: shaping chronic neuroinflammation[J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 276.
 - [30] Yang GZ, Hu Y, Qin XY, et al. Micheliolide attenuates neuroinflammation to improve cognitive impairment of Alzheimer's disease by inhibiting NF- κ B and PI3K/Akt signaling pathways[J]. *Heliyon*, 2023, 9(7): e17848.
 - [31] Cianciulli A, Porro C, Calvello R, et al. Microglia mediated neuroinflammation: focus on PI3K modulation[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(1): 137.
 - [32] Qin GW, Lu P, Peng L, et al. Ginsenoside Rb1 inhibits cardiomyocyte autophagy *via* PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and reduces myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Am J Chin Med*, 2021, 49(8): 1913-27.
 - [33] Li JH, Dong SZ, Quan SL, et al. Nuciferine reduces inflammation induced by cerebral ischemia-reperfusion injury through the PI3K/Akt/NF- κ B pathway[J]. *Phytomedicine*, 2024, 125: 155312.
 - [34] Fattahi S, Amjadi-Moheb F, Tabaripour R, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling in gastric cancer: Epigenetics and beyond[J]. *Life Sci*, 2020, 262: 118513.
 - [35] Maharati A, Moghbeli M. PI3K/AKT signaling pathway as a critical regulator of epithelial-mesenchymal transition in colorectal tumor cells[J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 201.
 - [36] Chen JL, Liu S, Zhang X, et al. *Bondarzewia dickinsii* against colitis-associated cancer through the suppression of the PI3K/AKT/COX-2 pathway and inhibition of PGE2 production in mice[J]. *Nutrients*, 2024, 16(23): 4048.
 - [37] Neill NE, Mauro LA, Pennisi A. Novel estrogen receptor - targeted therapies in hormone-receptor positive breast cancer[J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2025, 26(4): 302-12.
 - [38] Chen LP, Xing J, Lv JP, et al. Corynoxine suppresses lung adenocarcinoma proliferation and metastasis *via* inhibiting PI3K/AKT pathway and suppressing Cyclooxygenase-2 expression[J].

- Hereditas, 2024, 161(1): 41.
- [39] Zhu HR, Guo Y, Huang AL, et al. HDAC3-regulated PGE2 production by microglia induces phobic anxiety susceptibility after stroke and pointedly exploiting a signal-targeted gamma visual stimulation new therapy[J]. Front Immunol, 2022, 13: 845678.
- [40] Yan WJ, Ren DQ, Feng XX, et al. Neuroprotective and anti-inflammatory effect of pterostilbene against cerebral ischemia/reperfusion injury *via* suppression of COX-2[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 770329.
- [41] Gong YH, Qiu JX, Jiang T, et al. Maltol ameliorates intervertebral disc degeneration through inhibiting PI3K/AKT/NF- κ B pathway and regulating NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis[J]. Inflammopharmacology, 2023, 31(1): 369-84.
- [42] You ZJ, Yang ZZ, Cao S, et al. The novel KLF4/BIG1 regulates LPS-mediated neuro-inflammation and migration in BV2 cells *via* PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway[J]. Neuroscience, 2022, 488: 102-11.
- [43] Uddin S, Ahmed M, Hussain A, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition inhibits PI3K/AKT kinase activity in epithelial ovarian cancer[J]. Int J Cancer, 2010, 126(2): 382-94.
- [44] Lu EM, Wang Q, Li SC, et al. Profilin 1 knockdown prevents ischemic brain damage by promoting M2 microglial polarization associated with the RhoA/ROCK pathway[J]. J Neurosci Res, 2020, 98(6): 1198-212.
- [45] He TT, Li WL, Song YY, et al. Sestrin2 regulates microglia polarization through mTOR-mediated autophagic flux to attenuate inflammation during experimental brain ischemia[J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 329.
- [46] Xu X, Gao WW, Li L, et al. Annexin A1 protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by modulating microglia/macrophage polarization *via* FPR2/ALX-dependent AMPK-mTOR pathway[J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 119.
- [47] Liu XR, Wen SH, Yan F, et al. Salidroside provides neuroprotection by modulating microglial polarization after cerebral ischemia[J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1): 39.

(编辑:经 媛)