

布托啡诺调节IL-6/JAK2/STAT3信号通路对OGD/R诱导的神经细胞炎性损伤的影响

董丽强¹ 赵云龙² 李冰³ 石沛⁴ 赵滨滨^{1*}

(¹黑龙江中医药大学附属第一医院手术麻醉科, 哈尔滨 150000; ²哈尔滨市中医医院麻醉科, 哈尔滨 150000;

³黑龙江中医药大学附属第一医院周围血管病一科, 哈尔滨 150000;

⁴黑龙江中医药大学附属第一医院肿瘤一科, 哈尔滨 150000)

摘要 该文探究布托啡诺对氧糖剥夺/复氧(OGD/R)诱导的神经细胞炎性损伤的影响, 分析其机制是否与白细胞介素-6(IL-6)/蛋白酪氨酸激酶2(JAK2)/信号转导和转录激活因子3(STAT3)信号通路有关。将海马神经细胞HT22分为对照(CK)组(正常培养细胞)、OGD/R组、低剂量布托啡诺(L-布托啡诺)组(0.25 mmol/L)、中剂量布托啡诺(M-布托啡诺)组(0.5 mmol/L)、高剂量布托啡诺(H-布托啡诺)组(1.00 mmol/L)、H-布托啡诺+JAK2/STAT3信号通路激活剂colivelin(H-布托啡诺+colivelin)组(1.00 mmol/L+0.5 μmol/L colivelin)。CCK-8检测细胞活性; 流式细胞术检测细胞凋亡; ELISA检测IL-1β、TNF-α、IL-6水平; Western blot检测IL-6/JAK2/STAT3信号通路及凋亡相关蛋白表达情况。结果显示, 与CK组相比, OGD/R组细胞活力降低, 炎症因子(IL-6、TNF-α、IL-1β)表达水平、细胞凋亡率、凋亡相关蛋白Bax、caspase-3表达水平升高, Bcl-2表达水平降低, IL-6、p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3蛋白表达水平升高($P<0.05$); L-布托啡诺组、M-布托啡诺组、H-布托啡诺组较OGD/R组细胞活力升高, 炎症因子(IL-6、TNF-α、IL-1β)水平, 细胞凋亡率, 凋亡相关蛋白Bax、caspase-3表达水平降低, Bcl-2表达水平升高, IL-6、p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3蛋白表达水平降低($P<0.05$); H-布托啡诺+colivelin组较H-布托啡诺组细胞活力降低, 炎症因子(IL-6、TNF-α、IL-1β)水平, 细胞凋亡率, 凋亡相关蛋白Bax、caspase-3表达水平升高, Bcl-2表达水平降低, p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3蛋白表达水平升高($P<0.05$)。结果表明, 布托啡诺可以抑制IL-6/JAK2/STAT3信号通路, 减轻OGD/R诱导的神经细胞炎性损伤。

关键词 布托啡诺; IL-6/JAK2/STAT3信号通路; OGD/R; 神经细胞; 炎性损伤

The Effect of Butorphanol on OGD/R-Induced Inflammatory Damage of Neural Cells by Regulating the IL-6/JAK2/STAT3 Signaling Pathway

DONG Liqiang¹, ZHAO Yunlong², LI Bing³, SHI Pei⁴, ZHAO Binbin^{1*}

(¹Department of Surgical Anesthesia, First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150000, China; ²Department of Anesthesiology Harbin Traditional Chinese Medicine Hospital, Harbin 150000, China; ³Department of Peripheral

Vascular Disease First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150000, China;

⁴Department of Oncology First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150000, China)

Abstract This study was to investigate the effect of butorphanol on inflammatory damage of neural cells induced by OGD/R (oxygen glucose deprivation/reoxygenation), and to analyze whether its mechanism is related to the

收稿日期: 2024-12-05

接受日期: 2025-01-22

黑龙江省中医药管理局科研项目(批准号: ZHY2024-080)资助的课题

*通信作者。Tel: 18645065612, E-mail: zhaobinbinjili@163.com

Received: December 5, 2024

Accepted: January 22, 2025

This work was supported by the Scientific Research Project of Heilongjiang Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine (Grant No.ZHY2024-080)

*Corresponding author. Tel: +86-18645065612, E-mail: zhaobinbinjili@163.com

IL-6 (interleukin-6)/JAK2 (Janus kinase 2)/STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) signaling pathway. Hippocampal neural cells HT22 were assigned into control (CK) group (normal cultured cells), OGD/R group, low-dose butorphanol (L-butorphanol) group (0.25 mmol/L), medium-dose butorphanol (M-butorphanol) group (0.50 mmol/L), high-dose butorphanol (H-butorphanol) group (1.00 mmol/L), and H-butorphanol+JAK2/STAT3 signaling pathway activator colivelin group (1.00 mmol/L+0.50 μ mol/L colivelin). CCK-8 assay was used to detect cell viability; flow cytometry was employed to analyze cell apoptosis; ELISA was performed to measure the levels of IL-1 β , TNF- α , and IL-6, and Western blot was used to detect the IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway and apoptosis-related proteins. The results showed that compared with the CK group, in the OGD/R group, the cell viability decreased, while the levels of inflammatory factors (IL-6, TNF- α , IL-1 β), the cell apoptosis rate, and the apoptosis-related proteins Bax and caspase-3 increased, and the expression of Bcl-2 decreased. Additionally, the protein expressions of IL-6, p-JAK2/JAK2, and p-STAT3/STAT3 increased ($P<0.05$); compared with the OGD/R group, in the L-butorphanol group, M-butorphanol group, and H-butorphanol group, the cell viability increased, while the levels of inflammatory factors (IL-6, TNF- α , IL-1 β), the cell apoptosis rate, and the apoptosis-related proteins Bax and caspase-3 decreased, and the expression of Bcl-2 increased. Additionally, the protein expressions of IL-6, p-JAK2/JAK2, and p-STAT3/STAT3 decreased ($P<0.05$); compared with the H-butorphanol group, in the H-butorphanol+colivelin group, the cell viability decreased. The levels of inflammatory factors (IL-6, TNF- α , IL-1 β), the cell apoptosis rate, and the apoptosis-related proteins Bax and caspase-3 increased, while the expression of Bcl-2 decreased. Moreover, the protein expressions of p-JAK2/JAK2 and p-STAT3/STAT3 increased ($P<0.05$). The results indicated that butorphanol could inhibit the IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway and alleviate OGD/R-induced inflammatory damage of neural cells.

Keywords butorphanol; IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway; OGD/R; neural cells; inflammatory damage

目前,全球脑卒中患者达到3 300万人,其中病情严重会永久残疾^[1]。而缺血性脑卒中是其中常见的一种类型,属于中枢神经系统疾病,具有致死率高以及致残率高的特点^[2-3]。其中缺血再灌注损伤是缺血性脑卒中发生的一种重要脑损伤,严重影响患者的神经功能^[4]。相关研究发现,在缺血再灌注的早期,造成神经损伤加重的主要原因为细胞凋亡和炎症反应^[5]。HAO等^[6]研究发现,抑制细胞凋亡以及炎症反应,可以减轻缺血再灌注损伤。布托啡诺常用于缓解疼痛,且在麻醉前给药,其属于阿片受体部分激动剂的一种。已有相关研究发现,在脓毒症大鼠中,布托啡诺可通过减轻炎症反应来减轻其脑损伤^[7]。也有研究发现,布托啡诺可通过抑制细胞凋亡以及神经元的炎症反应,来调控神经功能^[8]。YANG等^[9]研究发现,布托啡诺对氧糖剥夺/复氧(oxygen glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)诱导的神经损伤具有保护作用。以上研究表明,布托啡诺具有减轻炎症反应、抑制细胞凋亡和保护神经损伤的作用。而白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)/蛋白酪氨酸激酶2(Janus kinase 2, JAK2)/信号转导和转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)

信号通路参与体内炎症反应的发生^[10],可以调节神经性疼痛^[11]。推测布托啡诺可调控IL-6/JAK2/STAT3信号通路,但布托啡诺调节IL-6/JAK2/STAT3信号通路对OGD/R诱导的神经细胞炎性损伤的影响尚不十分清楚。因此,本研究旨在探究布托啡诺对OGD/R诱导的神经细胞炎性损伤的影响,分析其机制是否与IL-6/JAK2/STAT3信号通路有关。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 海马神经细胞(HT22)(货号:CM-4517)购自上海宾穗生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器 布托啡诺(国药准字: H20020454)购自江苏恒瑞医药股份有限公司; colivelin(货号: HY-P1061A)购自美国 MedChem-Express公司; 胎牛血清(货号: 160047)、DMEM培养基(货号: 160044)购自武汉普诺赛生命科技有限公司; AnnexinV-FITC细胞凋亡检测试剂盒(货号: BL10002-100)购自上海帛龙生物科技有限公司; 白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂

盒(货号: SEKM-0002)、BCA蛋白检测试剂盒(货号: PC0020)购自北京索莱宝科技有限公司; 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA试剂盒(货号: ZK-R3838)、IL-6 ELISA试剂盒(货号: ZK-H2101)购自深圳子科生物科技有限公司; Bax(货号: ab270742)、Bcl-2(货号: ab117115)、caspase-3(货号: ab208161)、IL-6(货号: ab233551)、p-JAK2(货号: ab32101)、JAK2(货号: ab245303)、p-STAT3(货号: ab267373)、STAT3(货号: ab280202)和GAPDH抗体(货号: ab128915)以及IgG二抗(货号: ab205718)购自英国Abcam公司; CO₂细胞培养箱(型号: MCO-18AC)购自上海楚定分析仪器有限公司; 酶标仪(型号: PT-3502C)购自北京普天新桥技术有限公司; 流式细胞仪(型号: SP6800)购自索尼生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将细胞置于DMEM培养基(含10%胎牛血清)中,并在细胞培养箱(37 °C、5% CO₂)中培养,加入0.5 mL胰蛋白酶37 °C培养箱中消化,以1:3的比例传代,用于后续实验研究。

1.2.2 OGD/R模型构建及分组 根据参考文献[12]建立OGD/R模型: 首先将HT22细胞置于DMEM高糖培养基(含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素)中培养,传代后置于三气培养箱(5% CO₂、95% O₂、37 °C)培养24 h,之后更换DMEM无糖培养基(含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素),置于三气培养箱(5% CO₂、95% N₂、37 °C)缺氧培养4 h,之后置于高糖培养基中在三气培养箱(5% CO₂、95% O₂、37 °C)正常培养24 h,完成OGD/R模型构建,并将构建成功的OGD/R模型随机分为OGD/R组、低剂量布托啡诺(L-布托啡诺)组、中剂量布托啡诺(M-布托啡诺)组、高剂量布托啡诺(H-布托啡诺)组、H-布托啡诺+JAK2/STAT3信号通路激活剂colivelin(H-布托啡诺+colivelin)组。其中L-布托啡诺组、M-布托啡诺组、H-布托啡诺组分别加入0.25、0.50、1.00 mmol/L布托啡诺^[13]培养(将布托啡诺溶解于二甲基亚砜中制成不同浓度),H-布托啡诺+colivelin组在加入1.00 mmol/L布托啡诺的同时加入0.5 μ mol/L JAK2/STAT3信号通路激活剂colivelin共同培养^[14]。在正常培养基中进行培养的细胞为对照(CK)组。

1.2.3 CCK-8检测细胞活性 对各组细胞进行收集,并重悬使其细胞浓度为0.5 $\times$ 10⁵个/mL,在96孔板

中加入200 μ L细胞悬液,37 °C条件下培养12 h,之后加入10 μ L CCK-8溶液,37 °C条件下继续避光培养30 min。使用酶标仪在450 nm波长处检测样品 D 值。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 收集各组细胞,加入0.5 mL胰蛋白酶37 °C培养箱消化3 min后,加入PBS重悬,调整细胞浓度为1 $\times$ 10⁶个/mL,再分别添加5 μ L AnnexinV-FITC和10 μ L PI室温孵育10 min双重染色,混匀后暗处反应15 min。流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.5 ELISA检测细胞中IL-1 β 、TNF- α 、IL-6水平 收集各组细胞,并对其上清液进行4 °C、2 000 r/min离心5 min,弃沉淀保留上清液,分别按照ELISA试剂盒的说明书对IL-1 β 、TNF- α 、IL-6水平进行检测。

1.2.6 Western blot检测IL-6/JAK2/STAT3信号通路及凋亡相关蛋白 对各组HT22细胞进行收集,并在冰上进行裂解,4 °C、12 500 r/min离心20 min,提取总蛋白,并检测蛋白浓度(BCA试剂盒),之后进行电泳、转膜,之后将膜与5%脱脂奶粉在4 °C条件下进行2 h封闭处理,加入Bax(1:1 000)、Bcl-2(1:1 000)、caspase-3(1:1 000)、IL-6(1:1 000)、p-JAK2(1:1 000)、JAK2(1:1 000)、p-STAT3(1:1 000)、STAT3(1:1 000)和GAPDH(1:1 000)一抗4 °C摇床过夜孵育,之后与IgG二抗(1:3 000)室温反应2 h。各个蛋白的表达情况利用凝胶成像仪进行观察,ImageJ软件对蛋白条带灰度值进行分析。

1.3 统计学处理

数据分析采用SPSS 25.0软件。数据表示为均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$),多组间比较采用单因素方差分析,两两间比较采用SNK- q 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

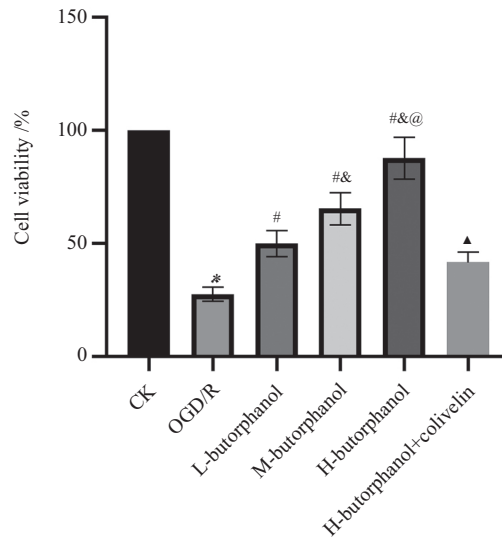
2 结果

2.1 布托啡诺升高HT22细胞活性

与CK组相比,OGD/R组细胞活力降低($P<0.05$); L-布托啡诺组、M-布托啡诺组、H-布托啡诺组较OGD/R组细胞活力呈剂量依赖性升高($P<0.05$); H-布托啡诺+colivelin组较H-布托啡诺组细胞活力显著降低($P<0.05$)(图1)。这表明布托啡诺可提高OGD诱导的RHT22细胞活性。

2.2 布托啡诺降低HT22细胞凋亡水平

与CK组相比,OGD/R组细胞凋亡率升高($P<0.05$); L-布托啡诺组、M-布托啡诺组、H-布托



* $P < 0.05$, 与CK组相比; # $P < 0.05$, 与OGD/R组相比; & $P < 0.05$, 与L-布托啡诺组相比; @ $P < 0.05$, 与M-布托啡诺组相比; ▲ $P < 0.05$, 与H-布托啡诺组相比。

* $P < 0.05$ compared with CK group; # $P < 0.05$ compared with OGD/R group; & $P < 0.05$ compared with L-butorphanol group; @ $P < 0.05$ compared with M-butorphanol group; ▲ $P < 0.05$ compared with H-butorphanol group.

图1 布托啡诺对HT22细胞活性的影响

Fig.1 The effect of butorphanol on the activity of HT22 cells

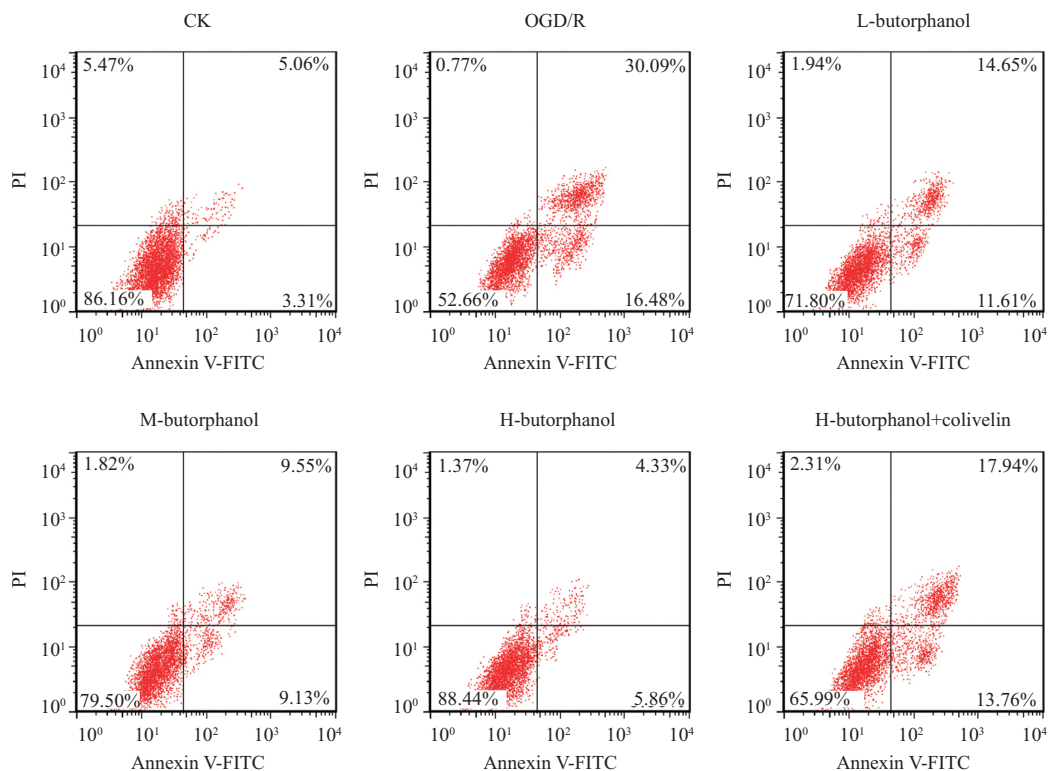


图2 流式细胞术检测细胞凋亡

Fig.2 Flow cytometry was used to detect cell apoptosis

啡诺组较 OGD/R 组细胞凋亡率呈剂量依赖性降低 ($P < 0.05$); H-布托啡诺+colivelin 组较 H-布托啡诺组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$) (图2和表1)。这表明布托啡诺可降低 OGD 诱导的 RHT22 细胞凋亡水平。

2.3 布托啡诺降低 HT22 细胞中炎症因子水平

与 CK 组相比, OGD/R 组 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平升高 ($P < 0.05$); L-布托啡诺组、M-布托啡诺组、H-布托啡诺组较 OGD/R 组, IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水

表1 布托啡诺对HT22细胞凋亡的影响
Table 1 The effect of Butorphanol on the apoptosis of HT22 cells

组别 Groups	凋亡率/% Apoptosis rate /%
CK	8.12±0.83
OGD/R	35.26±3.64*
L-butorphanol	25.85±2.67 [#]
M-butorphanol	18.37±1.92 ^{#&}
H-butorphanol	10.01±1.13 ^{#&@}
H-butorphanol+colivelin	30.21±3.17 [▲]

* $P<0.05$, 与CK组相比; [#] $P<0.05$, 与OGD/R组相比; [&] $P<0.05$, 与L-布托啡诺组相比; [@] $P<0.05$, 与M-布托啡诺组相比; [▲] $P<0.05$, 与H-布托啡诺组相比。 $n=6$ 。

* $P<0.05$ compared with CK group; [#] $P<0.05$ compared with OGD/R group; [&] $P<0.05$ compared with L-butorphanol group; [@] $P<0.05$ compared with M-butorphanol group; [▲] $P<0.05$ compared with H-butorphanol group. $n=6$ 。

表2 布托啡诺对HT22细胞炎性因子水平的影响
Table 2 The effect of butorphanol on the levels of inflammatory factors in HT22 cells

组别 Groups	IL-6 /ng·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	IL-1 β /pg·mL ⁻¹
CK	5.67±0.64	3.25±0.45	35.23±0.37
OGD/R	35.17±3.62*	23.76±2.43*	121.17±13.05*
L-butorphanol	26.81±2.75 [#]	14.37±1.53 [#]	98.51±10.07 [#]
M-butorphanol	17.37±1.81 ^{#&}	9.86±1.02 ^{#&}	71.23±7.63 ^{#&}
H-butorphanol	9.26±0.97 ^{#&@}	5.21±0.61 ^{#&@}	43.27±4.62 ^{#&@}
H-butorphanol+colivelin	9.18±0.95	15.33±1.63 [▲]	102.39±11.74 [▲]

* $P<0.05$, 与CK组相比; [#] $P<0.05$, 与OGD/R组相比; [&] $P<0.05$, 与L-布托啡诺组相比; [@] $P<0.05$, 与M-布托啡诺组相比; [▲] $P<0.05$, 与H-布托啡诺组相比。 $n=6$ 。

* $P<0.05$ compared with CK group; [#] $P<0.05$ compared with OGD/R group; [&] $P<0.05$ compared with L-butorphanol group; [@] $P<0.05$ compared with M-butorphanol group; [▲] $P<0.05$ compared with H-butorphanol group. $n=6$ 。

平呈剂量依赖性降低($P<0.05$); H-布托啡诺+colivelin组较H-布托啡诺组TNF- α 、IL-1 β 水平显著升高($P<0.05$)(表2)。这表明布托啡诺可降低OGD诱导的RHT22细胞中炎性因子水平。

2.4 布托啡诺对凋亡相关蛋白的影响

与CK组相比, OGD/R组Bax、caspase-3蛋白表达水平升高, Bcl-2蛋白表达水平降低($P<0.05$); L-布托啡诺组、M-布托啡诺组、H-布托啡诺组较OGD/R组, Bax、caspase-3蛋白表达水平降低, Bcl-2蛋白表达水平升高($P<0.05$); H-布托啡诺+colivelin组较H-布托啡诺组, Bax、caspase-3蛋白表达水平显著升高, Bcl-2蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)(图3)。这表明布托啡诺可影响OGD诱导的RHT22细胞中凋亡相关蛋白表达。

2.5 布托啡诺抑制IL-6/JAK2/STAT3信号通路

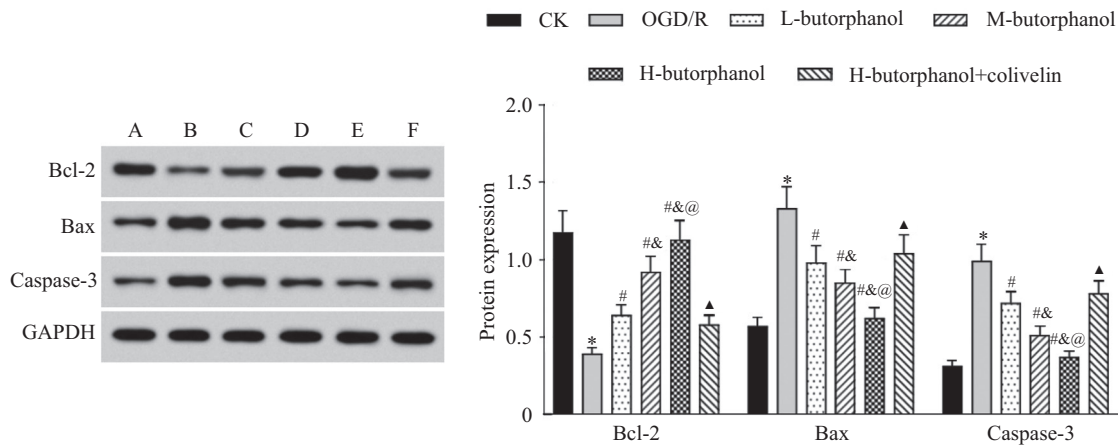
与CK组相比, OGD/R组IL-6、p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3蛋白表达水平升高($P<0.05$); L-布托

啡诺组、M-布托啡诺组、H-布托啡诺组较OGD/R组, IL-6、p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3蛋白表达水平呈剂量依赖性降低($P<0.05$); H-布托啡诺+colivelin组较H-布托啡诺组, p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)(图4)。这表明布托啡诺可抑制OGD诱导的RHT22细胞中IL-6/JAK2/STAT3信号通路。

3 讨论

缺血再灌注损伤会造成患者不良结局的发生^[15]。相关研究已经证实, OGD/R是一种模拟缺血再灌注损伤可靠的体外模型^[16]。本研究建立OGD/R诱导神经元损伤模型, 结果显示, OGD/R组较CK组细胞 D 值降低, 细胞凋亡率、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平升高, 表明经OGD/R诱导神经元受到损伤后, 其活性降低, 细胞凋亡及促进因子水平升高。

布托啡诺是一种脂溶性麻醉药物。已有报道称,

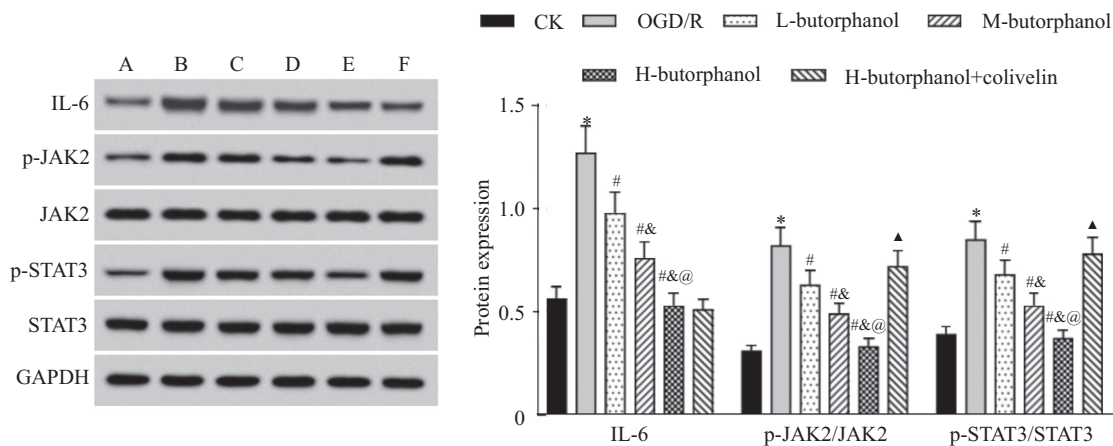


A: CK组; B: OGD/R组; C: L-布托啡诺组; D: M-布托啡诺组; E: H-布托啡诺组; F: H-布托啡诺+colivelin组。* $P<0.05$, 与CK组相比; # $P<0.05$, 与OGD/R组相比; & $P<0.05$, 与L-布托啡诺组相比; @ $P<0.05$, 与M-布托啡诺组相比; ▲ $P<0.05$, 与H-布托啡诺组相比。

A: CK group; B: OGD/R group; C: L-butorphanol group; D: M-butorphanol group; E: H-butorphanol group; F: H-butorphanol+colivelin group. * $P<0.05$ compared with CK group; # $P<0.05$ compared with OGD/R group; & $P<0.05$ compared with L-butorphanol group; @ $P<0.05$ compared with M-butorphanol group; ▲ $P<0.05$ compared with H-butorphanol group.

图3 Western blot检测HT22细胞中Bax、Bcl-2、caspase-3蛋白表达情况

Fig.3 The protein expressions of Bax, Bcl-2 and caspase-3 in HT22 cells detected by Western blot



A: CK组; B: OGD/R组; C: L-布托啡诺组; D: M-布托啡诺组; E: H-布托啡诺组; F: H-布托啡诺+colivelin组。* $P<0.05$, 与CK组相比; # $P<0.05$, 与OGD/R组相比; & $P<0.05$, 与L-布托啡诺组相比; @ $P<0.05$, 与M-布托啡诺组相比; ▲ $P<0.05$, 与H-布托啡诺组相比。

A: CK group; B: OGD/R group; C: L-butorphanol group; D: M-butorphanol group; E: H-butorphanol group; F: H-butorphanol+colivelin group. * $P<0.05$ compared with CK group; # $P<0.05$ compared with OGD/R group; & $P<0.05$ compared with L-butorphanol group; @ $P<0.05$ compared with M-butorphanol group; ▲ $P<0.05$ compared with H-butorphanol group.

图4 Western blot检测IL-6/JAK2/STAT3信号通路相关蛋白表达情况

Fig.4 The expressions of proteins related to the IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway detected by Western blot

布托啡诺对胫骨骨折术大鼠具有神经保护作用, 且能够改善其认知功能^[17]。还有研究发现, 布托啡诺还可以通过调控NF- κ B信号通路, 进而对TNF- α 、IL-1、IL-6水平进行抑制, 进而减轻脑损伤^[7]。HUANG等^[8]研究发现, 布托啡诺通过抑制p38/JNK/ATF2/p53信号通路, 减轻炎症反应, 发挥神经保护作用。这些研究均说明布托啡诺具有减轻炎症反应、保护神经的

作用。经OGD/R诱导后, 海马神经元会发生一定程度的凋亡以及损伤, 其主要原因为炎症反应加重, 因此, 通过对炎症反应进行抑制, 可以抑制OGD/R诱导的海马神经元凋亡^[18-19]。已有相关研究发现, 降低炎症因子IL-6、TNF- α 、IL-1 β 的表达水平, 可以减轻缺血再灌注损伤^[20]。以上均表明OGD/R诱导后, 海马神经元细胞炎症反应及细胞凋亡情况均加

重。在细胞凋亡的过程中, Bax是促进细胞凋亡的因子, 而Bcl-2是抑制细胞凋亡的因子, 且还可以抑制Bax的表达^[21]。而caspase常作为反映细胞凋亡情况的重要指标^[22]。本研究给予OGD/R诱导的海马神经元HT22不同剂量的布托啡诺进行干预, 结果发现不同剂量布托啡诺处理的细胞较OGD/R组, 细胞活力升高, 炎症因子(IL-6、TNF- α 、IL-1 β)表达水平降低, 细胞凋亡率, 凋亡相关蛋白Bax、caspase-3表达水平降低, Bcl-2表达水平升高, 提示布托啡诺可通过抑制由OGD/R诱导引发的炎症反应, 从而减少海马细胞的凋亡, 进而验证布托啡诺具有神经保护的功效, 与已有研究结果相一致。

已知, IL-6/JAK2/STAT3通路是常见的炎症反应相关通路, 而IL-6、TNF- α 、IL-1 β 等是常见的炎症因子。IL-6是一种参与炎症反应的细胞因子, 可以激活JAK2蛋白, 增加其磷酸化水平, 进一步促进STAT3磷酸化的发生, 且IL-6/JAK2/STAT3信号通路具有调控细胞凋亡、增殖、炎症反应等作用^[23]。已有相关研究发现, 通过对IL-6的表达进行抑制, 可以进一步抑制JAK2、STAT3的表达^[24-25]。本研究发现, OGD/R组较CK组, IL-6、p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3蛋白表达水平升高, 表明OGD/R构建模型中IL-6/JAK2/STAT3信号通路被激活。不同剂量布托啡诺组较OGD/R组, IL-6、p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3蛋白表达水平降低, 表明布托啡诺可能通过抑制IL-6蛋白表达, 进而抑制JAK2、STAT3磷酸化的发生。随后进一步用JAK2/STAT3信号通路激活剂colivelin进行回复实验, 结果发现, H-布托啡诺+colivelin组较H-布托啡诺组, 细胞活力降低, 炎症因子(IL-6、TNF- α 、IL-1 β)表达水平升高, 细胞凋亡率, 凋亡相关蛋白Bax、caspase-3表达水平升高, Bcl-2表达水平降低, p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3蛋白表达水平升高, 提示布托啡诺发挥抗凋亡以及炎症反应的作用可能是通过抑制IL-6/JAK2/STAT3信号通路实现的, 并可进一步减轻OGD/R诱导的神经细胞炎性损伤。

综上所述, 布托啡诺可能通过抑制IL-6/JAK2/STAT3信号通路, 减轻OGD/R诱导的神经细胞炎性损伤。但是本研究仅在细胞水平上进行, 后续会进一步在体内进行更加深入的研究。

参考文献 (References)

[1] MISHRA A, MALIK R, HACHIYA T, et al. Stroke genetics informs drug discovery and risk prediction across ancestries [J].

Nature, 2022, 611(7934): 115-23.

- [2] JOLUGBO P, ARIENS R A S. Thrombus composition and efficacy of thrombolysis and thrombectomy in acute ischemic stroke [J]. Stroke, 2021, 52(3): 1131-42.
- [3] SAINI V, GUADA L, YAVAGAL D R. Global epidemiology of stroke and access to acute ischemic stroke interventions [J]. Neurology, 2021, 97(12): S6-16.
- [4] GOEBEL U, SCHEID S, SPASSOV S, et al. Argon reduces microglial activation and inflammatory cytokine expression in retinal ischemia/reperfusion injury [J]. Neural Regen Res, 2021, 16(1): 192-98.
- [5] CHAI Z, GONG J, ZHENG P, et al. Inhibition of miR-19a-3p decreases cerebral ischemia/reperfusion injury by targeting IGFBP3 *in vivo* and *in vitro* [J]. Biol Res, 2020, 53(1): 17-25.
- [6] HAO M, XIE L, LENG W, et al. Trim47 is a critical regulator of cerebral ischemia-reperfusion injury through regulating apoptosis and inflammation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 515(4): 651-57.
- [7] MENG J, JIANG S J, JIANG D, et al. Butorphanol attenuates inflammation via targeting NF- κ B in septic rats with brain injury [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(3): 161-70.
- [8] HUANG Y S, LI S H, CHEN H X, et al. Butorphanol reduces the neuronal inflammatory response and apoptosis via inhibition of p38/JNK/ATF2/p53 signaling [J]. Exp Ther Med, 2022, 23(3): 229-36.
- [9] YANG Z J, WANG L, HU Y J, et al. Butorphanol protects PC12 cells against OGD/R-induced inflammation and apoptosis [J]. Mol Med Rep, 2020, 22(3): 1969-75.
- [10] GUAN X, WANG Q, LIU M, et al. Possible involvement of the IL-6/JAK2/STAT3 pathway in the hypothalamus in depressive-like behavior of rats exposed to chronic mild stress [J]. Neuropsychobiology, 2021, 80(4): 279-87.
- [11] LEE J Y, PARK C S, SEO K J, et al. IL-6/JAK2/STAT3 axis mediates neuropathic pain by regulating astrocyte and microglia activation after spinal cord injury [J]. Neurol, 2023, 370(1): 114576-82.
- [12] LI W, ZHU Q, XU X, et al. MiR-27a-3p suppresses cerebral ischemia-reperfusion injury by targeting FOXO1 [J]. Aging, 2021, 13(8): 11727-37.
- [13] GUO P L, HU Q F, WANG J D, et al. Butorphanol inhibits angiogenesis and migration of hepatocellular carcinoma and regulates MAPK pathway [J]. J Antibiot, 2022, 75(11): 626-34.
- [14] 司海超, 司小萌, 高毅, 等. 丙泊酚抑制IL-6诱导的A549肺癌细胞上皮间质转化及其机制探讨[J]. 现代肿瘤医学(SI H C, SI X M, GAO Y, et al. Propofol suppresses IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition of A549 lung cancer cells and its mechanism research [J]. Mod Oncol, 2018, 26(14): 2163-8.
- [15] LUO L, LIU M, FAN Y, et al. Intermittent theta-burst stimulation improves motor function by inhibiting neuronal pyroptosis and regulating microglial polarization via TLR4/NF κ B/NLRP3 signaling pathway in cerebral ischemic mice [J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 141-9.
- [16] LENG J, LIU W, LI L, et al. MicroRNA-429/Cxcl1 axis protective against oxygen glucose deprivation/reoxygenation-induced injury in brain microvascular endothelial cells [J]. Dose Response, 2020, 18(2): 710604679-87.
- [17] 杨清龄, 赵继波, 袁明霞, 等. 布托啡诺减轻老年大鼠胫骨骨折

- 术后认知功能障碍的作用机制研究[J]. 中国药师(YANG Q L, ZHAO J B, YUAN M X, et al. Action mechanism of butorphanol on cognitive dysfunction after tibial fracture surgery in aged rats [J]. China Pharmacist), 2021, 24(8): 440-4.
- [18] ZHU F, LUO E, YI F, et al. LncRNA ITS1-2 knockdown inhibits OGD/R-induced inflammation and apoptosis in mouse hippocampal neurons via sponging miR-195-5p [J]. Neuroreport, 2021, 32(16): 1325-34.
- [19] YANG F, CHEN R. Loss of PHLDA1 has a protective role in OGD/R-injured neurons via regulation of the GSK-3 β /Nrf2 pathway [J]. Hum Exp Toxicol, 2021, 40(11): 1909-20.
- [20] XIE D, LI M, YU K, et al. Etomidate alleviates cardiac dysfunction, fibrosis and oxidative stress in rats with myocardial ischemic reperfusion injury [J]. Ann Transl Med, 2020, 8(18): 1181-9.
- [21] CAMPBELL K J, TAIT S W G. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer [J]. Open Biol, 2018, 8(5): 180002-11.
- [22] 秦安敏, 司应明, 付盈盈, 等. 二氢杨梅素诱导人卵巢癌HO-8910细胞凋亡及机制研究[J]. 蚌埠医学院学报(QIN A M, SI Y M, FU Y Y, et al. Study on the apoptosis induced by dihydro-myricetin in human ovarian cancer HO-8910 cells and its mechanism [J]. J Bengbu Med Coll), 2021, 46(10): 1340-5.
- [23] 谭张奎, 向楠, 张妍, 等. PNU282987对小鼠心脏重塑的改善作用及对JAK2/STAT3信号通路的影响[J]. 中国药房(TAN Z K, XIANG N, ZHANG Y, et al. Effects of PNU282987 on improving cardiac remodeling and JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. Chin Pharm), 2021, 32(10): 1246-51.
- [24] 方欢乐, 李晓明, 倪敏弼, 等. 基于IL-6/JAK2/STAT3通路探讨补肾化痰方改善去势大鼠骨丢失的作用机制[J]. 中草药(FANG H L, LI X M, NI M M, et al. Mechanism of bushen huatan recipe on improving bone loss of ovariectomized rats based on IL-6/JAK2/STAT3 pathway [J]. Chin Herb Med), 2021, 52(16): 4904-12.
- [25] 欧更, 辛昊, 周南. 基于JAK2-STAT3 信号通路探讨硫酸羟氯喹治疗佐剂性类风湿性关节炎大鼠的作用机制[J]. 解剖科学进展(OU G, XIN H, ZHOU N, et al. Based on JAK2-STAT3 signaling pathway to explore the mechanism of hydroxychloroquine sulfate in the treatment of adjuvant rheumatoid arthritis rats [J]. Progress Anatomical Sciences), 2021, 27(3): 273-9.