

橘皮苷通过 PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路改善脊髓损伤后炎症微环境的机制研究

叶磊, 尤涛

(安徽医科大学附属省立医院骨科, 合肥 230001)

摘要 目的 探究橘皮苷对脊髓损伤小鼠后肢运动功能的影响机制。方法 以糖氧剥夺(OGD)模型诱导 PC12 神经元细胞脊髓损伤, 采用 CCK-8 法测定不同浓度(0、10、20、30、40、50、60 mmol/L)橘皮苷处理 24 h 后的细胞活力, 以确定后续实验最佳浓度。将 PC12 细胞分为 Control 组、OGD 组和橘皮苷(30 mmol/L) + OGD 组。通过 Hoechst 细胞染色法检测细胞凋亡, Western blot、qPCR 和免疫荧光检测橘皮苷对一氧化氮合酶(iNOS)、甘露糖受体(CD206)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的表达影响, 流式细胞术检测细胞凋亡情况。Western blot 检测橘皮苷对磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶(p-PI3K)、蛋白激酶 B(AKT)、磷酸化 AKT(p-AKT)和核因子 κ B(NF- κ B)的表达影响。取健康雄性 C57BL/6 小鼠 45 只, 随机均分为假手术(Sham)组、脊髓损伤(Sci)组、橘皮苷组, Sham 组和 Sci 组给予 0.1 mL PBS, 橘皮苷组给予 0.1 mL 橘皮苷。建模后检测 iNOS、CD206 和 TNF- α 表达水平、脊髓空洞情况及后肢运动功能。结果 10~30 mmol/L 橘皮苷干预 24 h 后, PC12 细胞活性与对照组无显著差异, Hoechst 染色显示 30 mmol/L 橘皮苷干预 24 h 后 PC12 细胞凋亡数明显减少。与 OGD 组相比, 橘皮苷 + OGD 组中炎症因子(iNOS 和 TNF- α)的 mRNA 和蛋白表达降低, 抗炎因子(CD206)的 mRNA 和蛋白表达上升, 并且橘皮苷处理后抑制了 PI3K/AKT/NF- κ B 通路的活化, 小鼠实验结果相同。与 Sci 组相比, 橘皮苷组脊髓空洞面积减少, 运动功能实验显示橘皮苷组小鼠后肢运动功能改善。结论 橘皮苷可能通过下调 PI3K/AKT/NF- κ B 通路磷酸化水平, 抑制炎症因子释放, 促进抗炎因子释放, 调控脊髓损伤后炎症微环境, 抑制急性期炎症反应, 促进小鼠后肢运动功能恢复。

关键词 脊髓损伤; 橘皮苷; 炎症微环境; PI3K/AKT/NF- κ B; 糖氧剥夺; PC12 神经元细胞

中图分类号 R 744.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)09-1614-10

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.09.007

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种常见的中枢神经系统损伤, 其病理过程涉及复杂的分子机制和细胞反应。SCI 后, 机体会发生一系列炎症反应, 包括炎症细胞的激活、炎症因子的释放以及细胞凋亡等, 这些反应共同构成了炎症微环境, 对神经功能的恢复产生负面影响^[1-3]。其中, 磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B/核因子 κ B(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/nuclear factor kappa-B, PI3K/AKT/NF- κ B)信号通路在调控炎症反应中起着关键作用^[4]。橘皮苷作为一种天然黄酮类化合物, 已被证实具有抗炎和抗氧化活性^[5-7], 但其对 SCI 后炎症微环境的影响及机制尚不清楚。本研究旨在通过构建 SCI 动物模型, 探讨橘皮苷对 SCI 后

炎症微环境及其后肢运动功能的影响, 并探讨 PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路在其中的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和实验动物 PC12 神经元细胞系购自武汉 Procell 生命科学技术有限公司; 本研究所选用的 45 只雄性 C57BL/6 小鼠(20~30 g; 许可证号: SCXK 2019-0004)均购自杭州资源实验动物科技有限公司。所有涉及动物的实验程序均遵循中国卫生研究院《实验动物护理与使用指南》, 所有实验方案均经中国科学技术大学第一附属医院实验动物中心动物伦理委员会批准, 批准号: 2024-N(A)-134。本研究尽最大努力减少使用动物的数量和造成的痛苦。采用光照/黑暗周期为 12 h 的标准实验笼对所有小鼠进行单独饲养, 并提供不受限制的食物和水。

1.1.2 主要试剂和仪器 高糖 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM, 货号: 319-205)购自加拿大 Wisent 公司; 10% 胎牛血清(货号: 35-081-CV)购自美国 Corning 公司; 100 U/mL 青霉素-链霉素-两性霉

2025-06-09 接收

基金项目: 安徽省高校自然科学研究项目(编号: 2023AH040394); 先导医学与前沿技术研究所科研项目(编号: 2023IHM 01073)

作者简介: 叶磊, 男, 硕士研究生;

尤涛, 男, 研究员, 主任医师, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: youtao@ustc.edu.cn

素 B 溶液(货号: C0224)、CCK-8 溶液(货号: C0038)、2% DMSO(货号: ST038)、PBS(货号: C0221A)、封闭缓冲液(货号: P0023B)、TRIzol 试剂(货号: R0016)、苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(货号: C0105)、Nissl 染色液(货号: C0117)均购自上海 Beyotime 公司; 橘皮苷(货号: HY-45337)购自美国 MCE 公司; 无葡萄糖脱氧 DMEM(货号: 11966025)购自美国赛默飞世尔科学公司; 聚偏二氟乙烯膜(货号: IEVH85R)购自美国默克生命公司; 4',6-二氨基-2-苯基吲哚反染色(货号: G1012)购自武汉 Servicebio 公司; Annexin V-AbFluor™ 488/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(货号: KTA0002)购自武汉亚科因生物技术有限公司; 一氧化氮合酶(iNOS)抗体(货号: 18985-1-AP)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)抗体(货号: 17590-1-AP)、甘露糖受体(CD206)抗体(货号: 18704-1-AP)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(货号: 60004-1-IG)、HRP 标记羊抗兔二抗(货号: PR30011)及 HRP 标记羊抗鼠二抗(货号: PR30012)均购自武汉三鹰生物技术有限公司; 磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)抗体(货号: 4292)、蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)抗体(货号: 4691)、磷酸化蛋白激酶 B(p-AKT)抗体(货号: 9271)、核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)抗体(货号: 8242)、Western blot 用二抗抗鼠(货号: 7076)、二抗抗兔(货号: 7074)均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 磷酸化 PI3K(p-PI3K)抗体(货号: AF3242)、ECL 试剂(货号: KF8003)均购自中国 Affinity 公司; HiScript II Q RT SuperMix reagent kit(货号: R122-01)、AceQ-qPCR SYBR Green Master Mix(货号: Q111-02)均购自南京 Vazyme 公司; 微孔板读取仪(型号: 1410101)、缺氧室(型号: 4131)、NanoDrop 分光光度计(型号: 840-317500)均购自美国赛默飞世尔科学公司; 小动物麻醉系统(型号: R500)购自深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司; 化学发光凝胶成像系统(型号: FluorChem R)购自美国 Proteinsimple 公司; qPCR 系统(型号: LightCycler480 II)购自瑞士 Roche 公司; 激光共聚焦显微镜(型号: Zeiss LSM800)、光学显微镜(型号: Axio Imager2)均购自德国蔡司公司; 扫描仪(型号: Panoramic DESK)购自北京博益伟业仪器有限公司; 流式细胞仪(型号: CytoFLEX)购自美国 Beckman coulter 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 原代神经干细胞由本课题组提取。细胞在 37 °C 含 5% CO₂ 的湿化气氛中,在 DMEM 中培养,添加 10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素-链霉素-两性霉素 B 溶液。

1.2.2 细胞毒性试验 预接种于 96 孔板的 PC12 细胞用不同浓度橘皮苷(0、10、20、30、40、50、60 mmol/L)在 37 °C 下处理 24 h。随后,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,在 37 °C 下再次孵育 30 min。使用微孔板读取仪在 450 nm 处测量每孔的吸光度值。

1.2.3 糖氧剥夺实验(oxygen glucose deprivation, OGD) 将 PC12 细胞用无葡萄糖脱氧 DMEM 并在缺氧室中 37 °C 下培养 4 h 培养。培养室中充满了预混气(5% CO₂ 和 95% N₂)。对照组在 DMEM 和 10% FBS 中培养相同时间。细胞药物预处理采用橘皮苷(30 mmol/L,浓度由 CCK-8 实验测定)预处理 2 h 后,再进行 OGD。

1.2.4 实验分组和处理 45 只小鼠随机分为 3 组:假手术组、Sci 组、橘皮苷组,每组 15 只。所有药物溶解于 2% DMSO 生理盐水中,并通过尾静脉给药。橘皮苷组在 SCI 后每日注射 0.1 mL 橘皮苷(30 mmol/L)。Sham 组和 Sci 组每日注射 0.1 mL PBS。所有药物在 SCI 后立即注射。

1.2.5 小鼠 SCI 造模 麻醉采用浓度为 3% 的七氟烷气体吸入诱导,并维持浓度为 1%,将小鼠置于恒温电热毯上,使其在整个手术过程和恢复期的体温保持在 37 °C。在第 11~12 胸椎(T11~T12)椎体进行标准的椎板切除术,露出一圈硬脊膜。然后,采用质量下降损伤模型和横断模型造成脊髓损伤^[8]。简而言之,从 15 mm 的高度将直径为 3.0 mm、质量为 15 g 的铁棒垂直自由落体到暴露的脊髓上。脊髓损伤后,使用 4-0 不可吸收的缝线将筋膜、肌肉和皮肤逐层缝合。假手术组小鼠同上手术,无重物敲击损伤。手术后,所有小鼠每天人工排空膀胱 3 次。

1.2.6 贝索-比替-布雷斯纳汉(basso-beattie-bresnahan, BBB)评分评估脊髓功能 观察小鼠 SCI 后 4 周的行为,包括步态、肢体协调、跛行和肢体运动。由不知道研究分组的无关人员使用 BBB 评分系统对这些观察结果进行定量评分,每只小鼠由 3 人同时进行评估,评分范围从 0~21。0 分表示没有运动功能,21 分表示运动功能正常。对记录的评分进行统计分析,比较不同组小鼠在脊髓损伤后 1、3、7、14、21 和 27 d 的康复进展。

1.2.7 足迹分析 采用足迹分析法评价 SCI 后小

鼠的神经运动功能。将不同组小鼠的后肢浸入红色和蓝色墨水中,让小鼠在白色轨道上行走,记录其运动轨迹。测量步幅宽度和步幅长度。步幅宽度指脚印之间的距离,步幅长度指两个连续脚印之间的距离。所有行为评估均由对小组分配不知情的调查人员进行。

1.2.8 斜板实验 所有小鼠均置于测试装置上(即覆盖有包含间隔 3 mm 的水平的橡胶垫)。小鼠身体纵轴与斜板纵轴平行放置,小鼠头朝斜板抬高侧,从 0 度开始以每次抬高 5 度角度,记录小鼠在斜板上停留 5 s 的最大角度,每只动物测 3 次,取其平均值作为测定值。

1.2.9 蛋白质印迹试验 从 PC12 细胞或脊髓组织中提取总蛋白,进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。随后,将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜,在室温下封闭缓冲液中封闭 1 h。然后将膜与以下一抗在 4 ℃ 下孵育过夜: iNOS (1 : 1 000), CD206 (1 : 1 000), TNF- α (1 : 1 000), GAPDH (1 : 50 000)。第 2 天,用相应的辣根过氧化物酶偶联二抗: HRP 偶联亲和纯山羊抗兔 IgG (H + L) (1 : 50 000) 和 HRP 偶联亲和纯山羊抗小鼠 IgG (H + L) (1 : 50 000) 在 25 ℃ 下孵育 2 h。使用 ECL 试剂对蛋白信号进行可视化,使用化学发光凝胶成像系统获得图像。使用 ImageJ 软件对获得的图像进行定量分析。所有实验重复 3 次,结果归一化到空白组。

1.2.10 qPCR 根据制造商的说明,使用 TRIzol 试剂,从处理过的 PC12 细胞中分离总 RNA。用 Nano-Drop 分光光度计测定 RNA 浓度。随后,使用 HiScript II Q RT SuperMix reagent kit 将 RNA 反转录为 cDNA,为 qPCR 提供模板。采用 AceQ-qPCR SYBR Green Master Mix 和 qPCR 系统检测 qPCR。用于检测 iNOS、CD206、TNF- α 和 GAPDH,引物序列见表 1。用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法将目的基因的相对表达量归一化为内参基因 GAPDH。

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

Primer name	Sequence (5'-3')	Length (bp)
iNOS	F: ACATCGACCCGTCCACAGTAT	177
	R: CTCTGTTCCGATGGGGAGAC	
CD206	F: CTCTGTTTCAGCTATTGGACGC	190
	R: CGCAGGTTATCGACTTGTCTC	
TNF- α	F: CAGGCGGTGCCTATGTCTC	89
	R: GATGACTTGAAGCCCCACTAGC	

1.2.11 免疫荧光染色 细胞免疫荧光染色,将 PC12 细胞接种于盖片上,在 24 孔板中培养。预处理后,收集盖板,在 4% 多聚甲醛中浸泡 30 min,然后用 0.5% Triton X-100 渗透。石蜡包埋脊髓组织切片脱蜡、复水化,用乙二胺四乙酸抗原回收缓冲液 (pH 8.0) 进行抗原回收。用 10% 牛血清白蛋白阻断在盖片或上述处理的组织切片上生长的细胞,然后用以下一抗在 4 ℃ 下孵育过夜: iNOS (1 : 1 000), CD206 (1 : 1 000), TNF- α (1 : 1 000)。第 2 天,切片或盖片与 coralite488 偶联山羊抗兔 IgG (H + L) (1 : 400) 和 coralite594 偶联山羊抗兔 IgG (H + L) (1 : 400) 二抗室温孵育 30 ~ 60 min。然后,细胞核用 4',6-二氨基-2-苯基吡啶反染色。使用扫描仪捕获免疫荧光染色图像。为了量化荧光信号,在 3 个不同的感兴趣区域测量荧光的强度和百分比。

1.2.12 脊髓组织学分析 从脊髓损伤处上 0.5 cm 到下 0.5 cm 的脊髓区域进行切片,并对切片进行组织学分析。苏木精-伊红染色和尼氏染色程序严格按照试剂盒制造商的指导方针进行。染色后,每个组织切片进行乙醇脱水,二甲苯清洗 10 min,中性胶密封。然后使用扫描设备显示染色的切片。

1.2.13 流式细胞术 流式细胞术采用 Annexin V-AbFluor™ 488/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡率。使用 BECKMAN COULTER CytoFLEX 对数据进行测量和分析。

1.2.14 统计学处理 应用 SPSS 25.0 统计软件进行分析,数据以均数 $\pm$ 标准差表示。统计分析采用独立样本 *t* 检验和单、多因素方差分析,采用 Bonferroni 事后检验确定两组间有无显著性差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 橘皮苷对 PC12 细胞活性的影响 橘皮苷的 2D 和 3D 化学结构式见图 1A。使用 0 ~ 60 mmol/L 橘皮苷分别处理 PC12 细胞 24 h 后,使用 CCK-8 检测 PC12 细胞活性,发现在 10、20 和 30 mmol/L 处理后,PC12 细胞活性无明显下降,当浓度上升至 40 mmol/L 时 PC12 细胞活性明显下降(均 $P_{\text{Bonferroni}} < 0.01$)。见图 1B。后续实验选取 30 mmol/L 作为橘皮苷的终浓度。随后为了检测橘皮苷是否可以挽救 OGD 导致的 PC12 细胞凋亡,采用 Hoechst 细胞染色法检测 PC12 细胞活性。与 OGD 组相比,橘皮苷 + OGD 组中 PC12 细胞凋亡率下降。见图 1C。

2.2 橘皮苷抑制了炎症反应 提取 Control 组、OGD

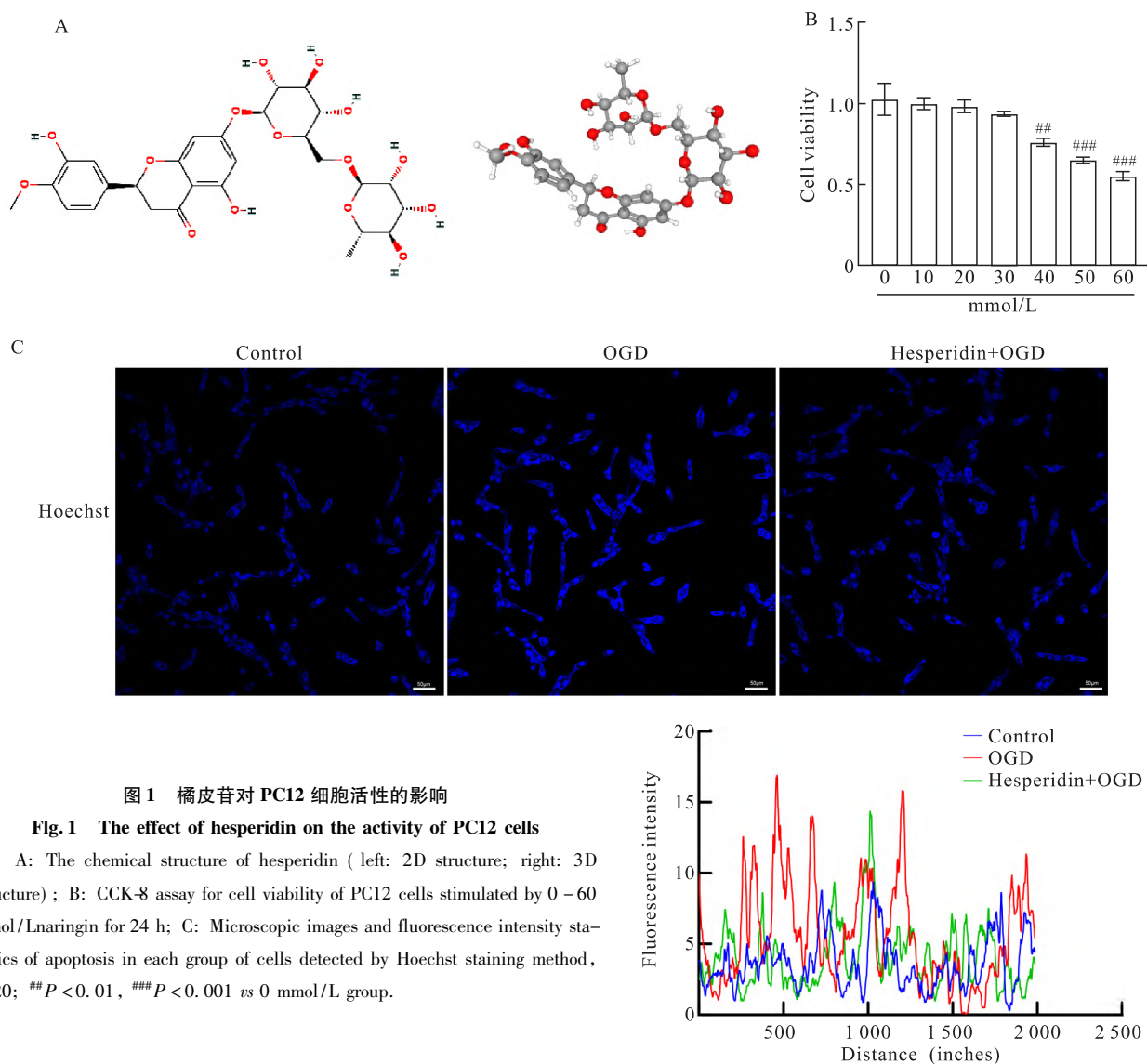


图1 橘皮苷对 PC12 细胞活性的影响

Fig. 1 The effect of hesperidin on the activity of PC12 cells

A: The chemical structure of hesperidin (left: 2D structure; right: 3D structure); B: CCK-8 assay for cell viability of PC12 cells stimulated by 0-60 mmol/L naringin for 24 h; C: Microscopic images and fluorescence intensity statistics of apoptosis in each group of cells detected by Hoechst staining method, $\times 20$; $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$ vs 0 mmol/L group.

组和橘皮苷 + OGD 组各组细胞的蛋白,使用 Western blot 检测炎症相关指标的蛋白表达情况。Western blot 结果表明,与 OGD 组相比,橘皮苷 + OGD 组 iNOS ($t = 11.25$, $P < 0.001$) 和 TNF- α ($t = 11.32$, $P < 0.001$) 的表达明显降低,CD206 ($t = -6.24$, $P < 0.001$) 的表达明显上升。见图 2A。对 Control 组、OGD 组和橘皮苷 + OGD 组各组细胞进行免疫荧光染色,展示出与 Western blot 相同的结果。见图 2B。qPCR(图 2C) 也展示了同样的结果 (iNOS, $t = 14.41$; TNF- α , $t = 12.99$; CD206, $t = -10.30$, 均 $P < 0.001$)。见图 2C。

2.3 橘皮苷抑制 PI3K/AKT/NF- κ B 通路磷酸化水平,减轻了 PC12 细胞凋亡 Western blot 结果表明,相对于 Control 组,OGD 组 PC12 细胞的 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、NF- κ B 蛋白表达上升 ($t =$

-15.50 、 -9.85 、 -26.35 , 均 $P < 0.001$), 而与 OGD 组比较,橘皮苷则下调 PC12 细胞的 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、NF- κ B 蛋白水平 ($t = 14.932$ 、 7.038 、 9.784 , 均 $P < 0.001$)。见图 3A。流式细胞术显示,OGD 组中 PC12 细胞的凋亡率上升,橘皮苷 + OGD 组逆转了这种情况。见图 3B。同时小鼠实验也发现橘皮苷处理后,与 Sci 组比较,橘皮苷下调 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、NF- κ B ($t = 7.276$ 、 6.975 、 9.276 , 均 $P < 0.001$) 蛋白水平,抑制了脊髓损伤区域内细胞的凋亡。见图 3C、3D。

2.4 橘皮苷促进小鼠 SCI 后后肢运动功能恢复

术后 28 天,通过解剖直接观察脊髓,与 Sci 组相比,橘皮苷组的损伤面积明显减少。见图 4A。BBB 评分、步态分析和斜板实验显示,橘皮苷组小鼠 BBB 评分 ($t = -6.96$, $P < 0.001$)、步态稳定性 ($t =$

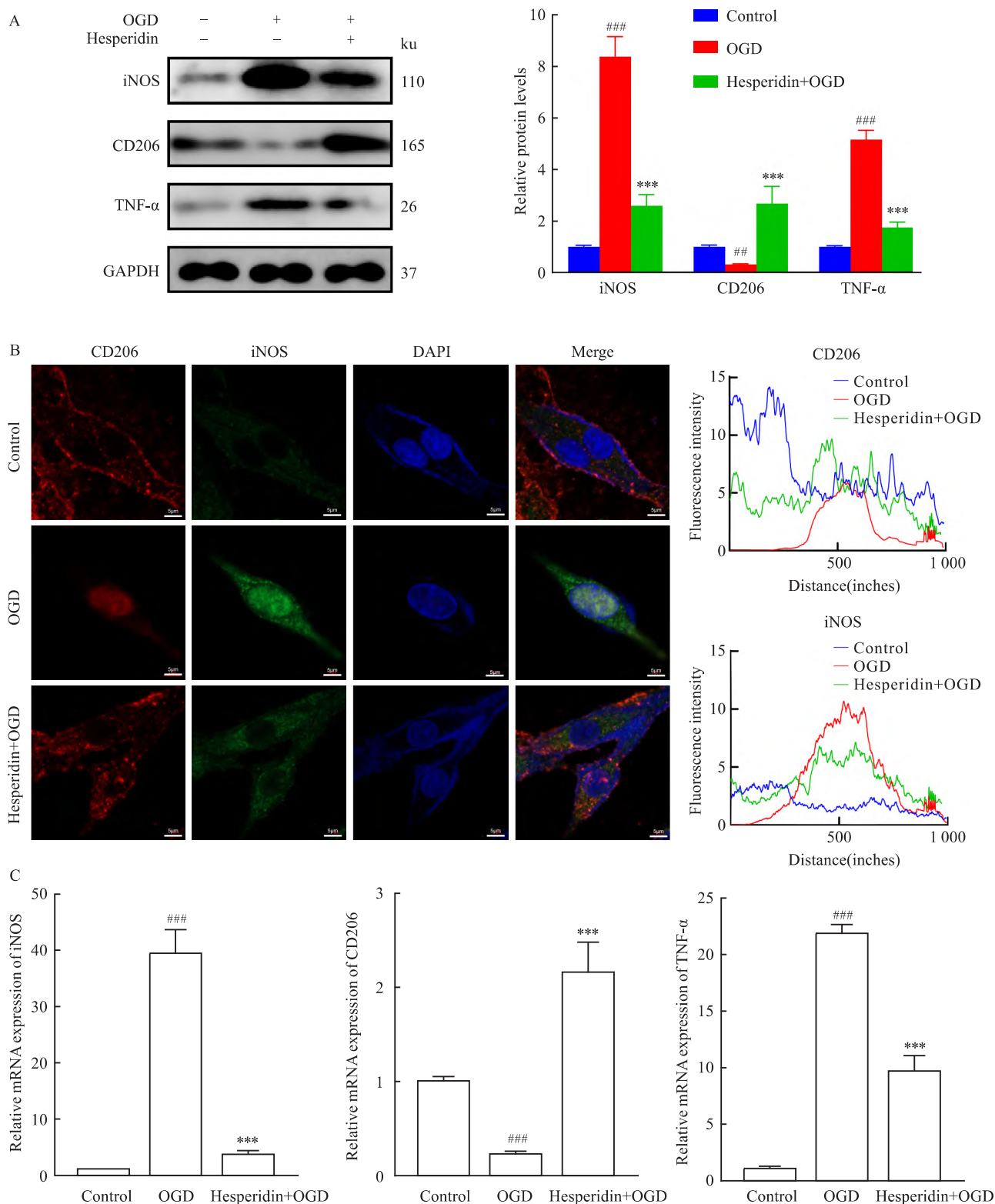


图2 橘皮苷抑制了炎症反应

Fig.2 Hesperidin inhibited inflammatory response

A: WB was used to detect the expression levels of iNOS, CD206 and TNF- α proteins in each group; B: Immunofluorescence staining was used to detect the expression and localization of iNOS and CD206 in PC12 cells in each group and the statistical graphs $\times 200$; C: qPCR method was used to detect the expression levels of iNOS, CD206 and TNF- α mRNA in each group; *** $P < 0.001$ vs OGD group; ### $P < 0.001$ vs Control group.

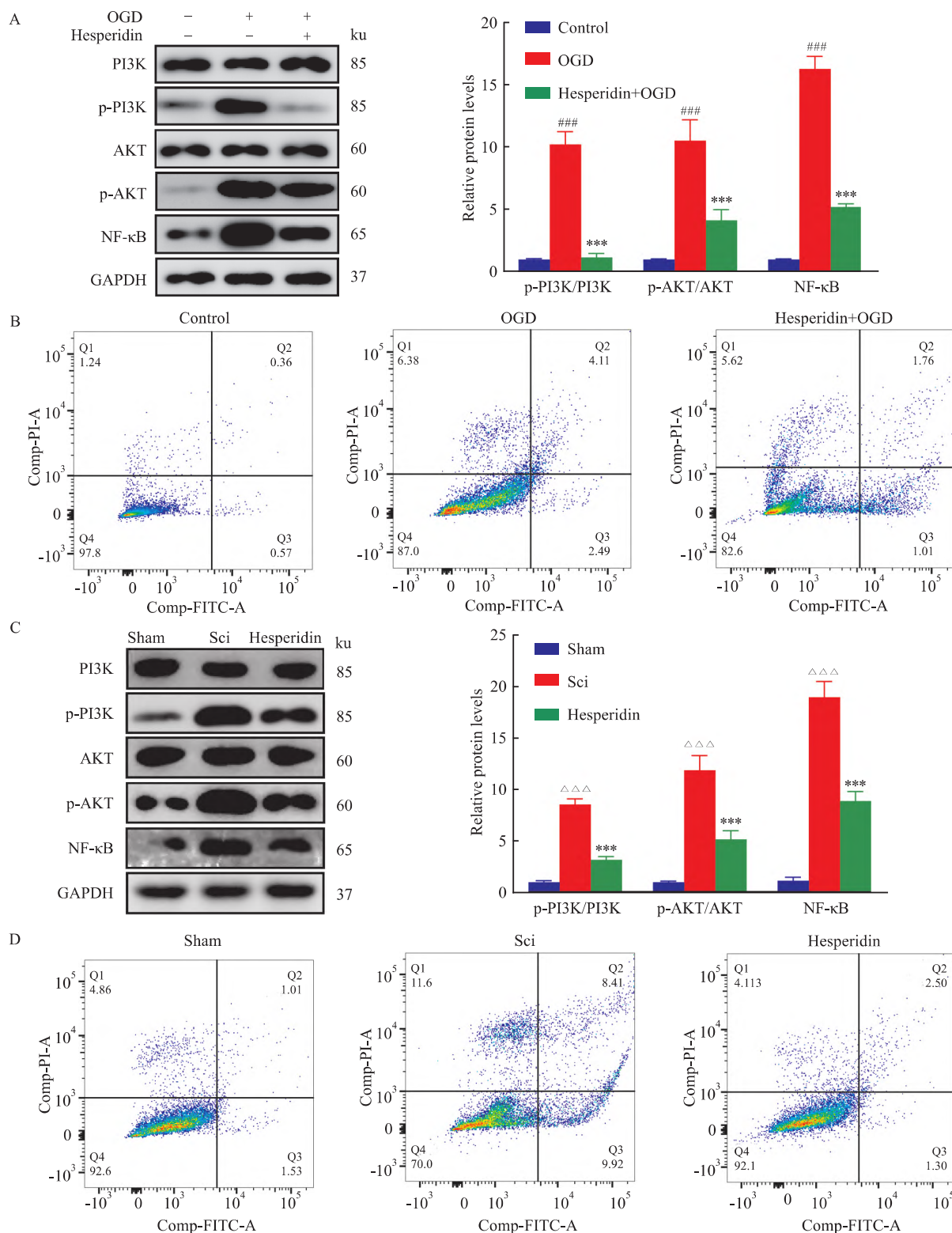


图3 橘皮苷抑制 PI3K/AKT/NF-κB 通路磷酸化水平,减轻了 PC12 细胞凋亡

Fig. 3 Hesperidin inhibited the phosphorylation levels of the PI3K/AKT/NF-κB pathway and reduced apoptosis in PC12 cells

A: The expression and quantitative statistical graphs of PI3K, p-PIK, AKT, p-AKT and NF-κB proteins in PC12 cells of each group were detected by Western blot; B: Flow cytometry analysis of PC12 cell apoptosis, with Annexin V staining and PI analysis to determine cell apoptosis; C: The expression and quantitative statistical graphs of PI3K, p-PIK, AKT, p-AKT and NF-κB proteins in PC12 cells of each group were detected by Western blot; D: Flow cytometry analysis of apoptosis in damaged spinal cord tissues of mice; *** $P < 0.001$ vs OGD group; ### $P < 0.001$ vs Control group; △△△ $P < 0.001$ vs Sham group.

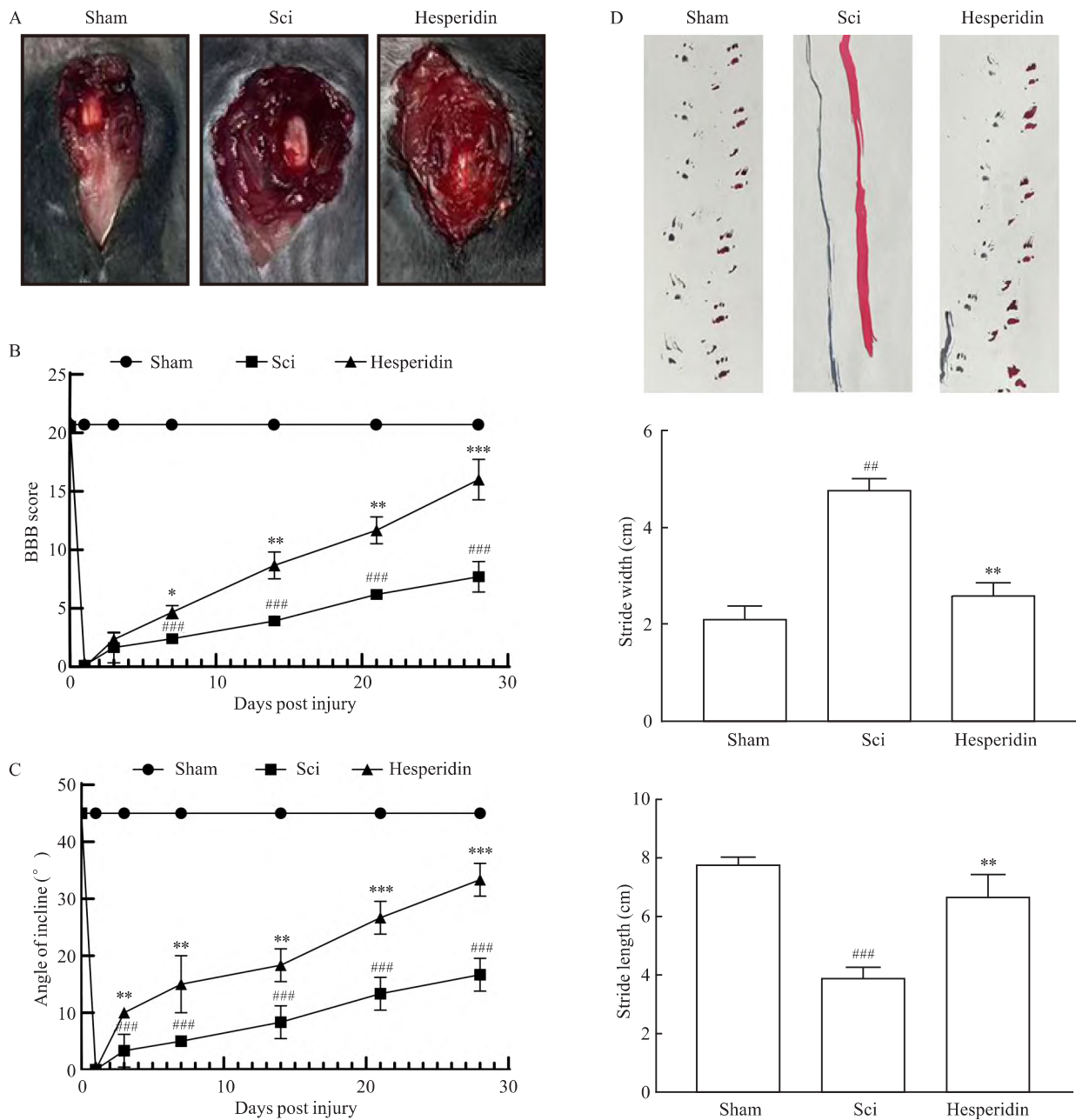


图4 橘皮苷促进小鼠脊髓损伤后后肢运动功能恢复

Fig.4 Hesperidin promoted the recovery of hindlimb motor function in mice after Sci

A: Recovery images of spinal cord injury in each group of mice; B: Comparison of BBB scores of each group of mice after surgery; C: Comparison of the incline angle of each group of mice after surgery; D: left: Gait analysis of each group of mice 28 days after Sci; Comparison of gait width (middle) and length (right) of each group of mice 28 days after Sci; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Sci group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs Sham group.

-7.07, $P < 0.001$) 和后肢支撑性优于 Sci 组 ($t = -2.71$, $P < 0.01$)。见图 4B-4D。

2.5 橘皮苷抑制了 SCI 小鼠体内的炎症反应, 减少了 SCI 后脊髓空洞 术后 28 天后, 与 Sci 组相比, 橘皮苷组脊髓空洞减小 ($t = 2.77$, $P < 0.05$), 神经元增加 ($t = -1.37$, $P < 0.05$)。见图 5A。West-

ern blot 结果表明, 与 Sci 组相比, 橘皮苷组 iNOS ($t = 8.92$, $P < 0.001$)、TNF- α ($t = 11.11$, $P < 0.001$) 表达降低, CD206 ($t = -2.64$, $P < 0.05$) 表达上升。见图 5B。免疫荧光染色发现橘皮苷处理后, 促炎因子 iNOS ($t = 8.40$, $P < 0.001$) 明显减少, 抗炎因子 CD206 ($t = -3.75$, $P < 0.01$) 明显增加。见图 5C。

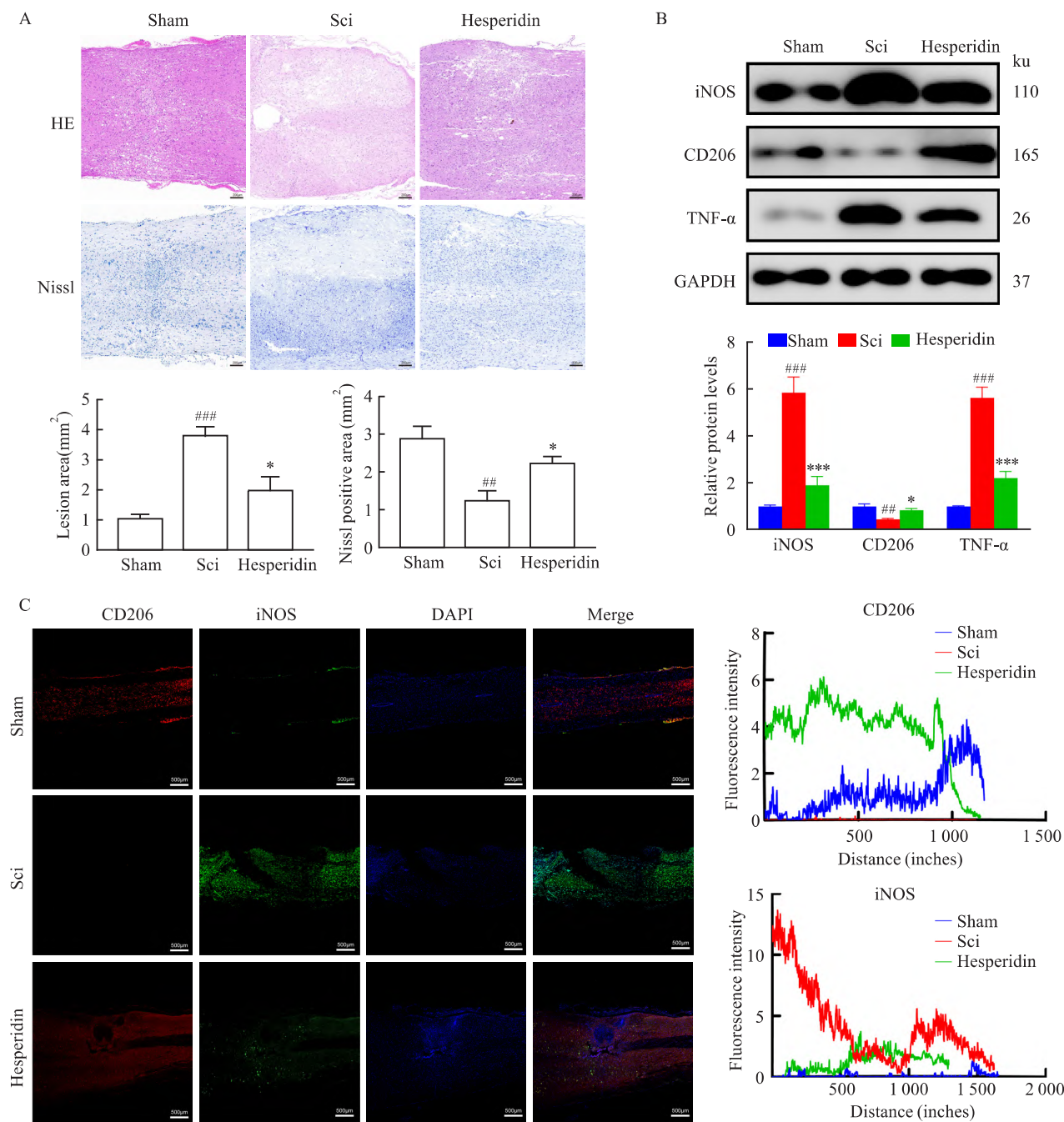


图5 橘皮苷抑制了SCI小鼠体内的炎症反应,减少了SCI后脊髓空洞

Fig. 5 Hesperidin inhibited the inflammatory response in the bodies of SCI mice and reduced the spinal cord cavities after SCI

A: HE staining and Nissl staining of the longitudinal section of the spinal cord of mice 28 days after SCI; the upper right showed the area of spinal cord cavities in each group, and the lower right showed the number of neurons per square millimeter in each group, $\times 5$; B: The expression and quantitative statistical graphs of iNOS, CD206 and TNF- α proteins in each group were detected by Western blot; C: Immunofluorescence staining was used to detect the expression and localization of iNOS and CD206 in spinal cord tissues in each group and the quantitative statistical graphs were shown $\times 2$; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs Sci group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs Sham group.

3 讨论

橘皮苷作为一种天然存在于柑橘属植物中的黄酮类化合物,已被广泛研究其抗炎作用^[5,9]。研

究^[10]表明,橘皮苷通过多种机制发挥抗炎效果,它能够减少关节炎大鼠的足趾肿胀和关节炎评分,改善红细胞和血小板计数,显著降低血清中 γ 干扰素和白细胞介素-4(IL-4)水平。有研究^[11]发现橘皮

昔能够通过抑制炎症介质基因表达,缓解抗原诱导的关节炎,表明其具有显著的抗炎活性。此外,橘皮昔还能通过抑制相关炎症信号通路的激活,减少炎症靶点如 NF- κ B、iNOS、环氧化酶-2(COX-2)以及慢性炎症标志物的表达,从而起到抗炎效果^[12],提示其可能通过抑制 PI3K/AKT 信号通路治疗类风湿关节炎。本研究显示,橘皮昔在体外实验中能够降低 OGD 诱导的 PC12 细胞中 iNOS 和 TNF- α 的表达,同时升高 CD206 的表达,提示橘皮昔可能通过抑制炎症因子的表达和促进抗炎因子的表达,发挥其抗炎作用。在体内实验中,橘皮昔处理的 SCI 小鼠也表现出相似的趋势,即 iNOS 和 TNF- α 表达降低,CD206 表达升高,进一步证实了橘皮昔在 SCI 中的抗炎作用。与既往研究相比,本研究不仅再次验证了橘皮昔的抗炎特性,还首次将其应用于 SCI 模型,拓展了橘皮昔在神经领域应用的可能性。

SCI 后,炎症微环境的改变是影响神经功能恢复的关键因素之一^[1,13]。在 SCI 的病理过程中,原发性损伤对脊髓神经结构的伤害难以逆转,因此目前的治疗研究主要集中在减轻继发性损伤和促进再生。SCI 后炎症反应始终存在,这与免疫细胞在炎症反应的不同时间、不同损伤部位发挥不同作用密切相关^[14]。SCI 后,细胞微环境中细胞间的相互作用组分中,占比最高的胶质细胞间的相互作用,且与神经元的相互调控作用最为关键^[15-17]。在 SCI 后的细胞外调节因子中,促炎因子如 TNF- α 和 iNOS 等加剧了细胞微环境的炎症反应,应用受体抑制剂或阻断相关通路来抑制上述促炎因子的表达是一种有效的治疗方法,同时在脊髓微环境中增加 CD206 等抗炎因子的表达,抑制损伤区域炎症发展的研究也陆续出现^[18]。本研究结果显示,橘皮昔可以减少受损神经元的凋亡,且体内实验均显示 p-PI3K、p-AKT 和 NF- κ B 表达下降,提示由于橘皮昔可能通过抑制 PI3K/AKT/NF- κ B 通路激活,抑制炎症因子释放,促进抗炎因子释放,调控炎症微环境,从而促进 SCI 后的运动功能恢复。这一发现为 SCI 的治疗提供了新的潜在靶点和治疗策略。

值得注意的是,本研究中橘皮昔在改善 SCI 小鼠后肢运动功能方面表现出显著效果,这不仅与其抗炎作用有关,还可能与其对神经元的保护作用有关。在体外实验中,橘皮昔能够显著降低 OGD 诱导的 PC12 细胞凋亡率,这表明其对神经元具有一定的保护作用。这种保护作用可能通过多种途径实现,除了抑制炎症反应外,还可能涉及抗氧化、调节

细胞内钙稳态等机制。然而,本研究主要关注其抗炎机制,对于其他潜在机制尚未深入探讨,这将是未来研究的一个重要方向。

参考文献

- [1] Anjum A, Yazid M D, Fauzi Daud M, et al. Spinal cord injury: pathophysiology, multimolecular interactions, and underlying recovery mechanisms [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7533. doi: 10.3390/ijms21207533.
- [2] Hellenbrand D J, Quinn C M, Piper Z J, et al. Inflammation after spinal cord injury: a review of the critical timeline of signaling cues and cellular infiltration [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 284. doi: 10.1186/s12974-021-02337-2.
- [3] Huang W, Wu D, Cai C, et al. Inhibition of MST1 ameliorates neuronal apoptosis via GSK3 β / β -TrCP/NRF2 pathway in spinal cord injury accompanied by diabetes [J]. *Redox Biol*, 2024, 71: 103104. doi: 10.1016/j.redox.2024.103104.
- [4] Pan L, Cheng Y, Yang W, et al. Nintedanib ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis, inflammation, apoptosis, and oxidative stress by modulating PI3K/Akt/mTOR pathway in mice [J]. *Inflammation*, 2023, 46(4): 1531-42. doi: 10.1007/s10753-023-01825-2.
- [5] Ma R, You H, Liu H, et al. Hesperidin: a Citrus plant component, plays a role in the central nervous system [J]. *Heliyon*, 2024, 10(21): e38937. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e38937.
- [6] Kaewngam S, Prajit R, Anosri T, et al. The effects of hesperidin on valproic acid-induced reduction in hippocampal neurogenesis through the antioxidant and apoptotic pathways in adult rats [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 28864. doi: 10.1038/s41598-024-80183-x.
- [7] Lou J, Wu F, He W, et al. Hesperidin activates Nrf2 to protect cochlear hair cells from cisplatin-induced damage [J]. *Redox Rep*, 2024, 29(1): 2341470. doi: 10.1080/13510002.2024.2341470.
- [8] Ridlen R, McGrath K, Gorrie C A. Animal models of compression spinal cord injury [J]. *J Neurosci Res*, 2022, 100(12): 2201-12. doi: 10.1002/jnr.25120.
- [9] Abd-Eldayem A M, Makram S M, Messiha B A S, et al. Cyclosporine-induced kidney damage was halted by sitagliptin and hesperidin via increasing Nrf2 and suppressing TNF- α , NF- κ B, and Bax [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 7434. doi: 10.1038/s41598-024-57300-x.
- [10] Ahmad S, Mittal S, Gulia R, et al. Therapeutic role of hesperidin in collagen-induced rheumatoid arthritis through antiglycation and antioxidant activities [J]. *Cell Biochem Funct*, 2022, 40(5): 473-80. doi: 10.1002/cbf.3708.
- [11] Qi W, Lin C, Fan K, et al. Hesperidin inhibits synovial cell inflammation and macrophage polarization through suppression of the PI3K/AKT pathway in complete Freund's adjuvant-induced arthritis in mice [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 306: 19-28. doi: 10.1016/j.cbi.2019.04.002.

- [12] Kodous A S, Abdel-Maksoud M A, El-Tayeb M A, et al. Hesperidin-loaded PVA/alginate hydrogel: targeting NF κ B/iNOS/COX-2/TNF- α inflammatory signaling pathway [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1347420. doi: 10.3389/fimmu.2024.1347420.
- [13] Orr M B, Gensel J C. Spinal cord injury scarring and inflammation: therapies targeting glial and inflammatory responses [J]. *Neurotherapeutics*, 2018, 15 (3): 541 - 53. doi: 10.1007/s13311-018-0631-6.
- [14] Gensel J C, Zhang B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury [J]. *Brain Res*, 2015, 1619: 1 - 11. doi: 10.1016/j.brainres.2014.12.045.
- [15] O'Shea T M, Burda J E, Sofroniew M V. Cell biology of spinal cord injury and repair [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(9): 3259 - 70. doi: 10.1172/JCI90608.
- [16] Fan B, Wei Z, Yao X, et al. Microenvironment imbalance of spinal cord injury [J]. *Cell Transplant*, 2018, 27 (6): 853 - 66. doi: 10.1177/0963689718755778.
- [17] Li C, Wu Z, Zhou L, et al. Temporal and spatial cellular and molecular pathological alterations with single-cell resolution in the adult spinal cord after injury [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 65. doi: 10.1038/s41392-022-00885-4.
- [18] Li Z, Wu F, Xu D, et al. Inhibition of TREM1 reduces inflammation and oxidative stress after spinal cord injury (SCI) associated with HO-1 expressions [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 2014 - 21. doi: 10.1016/j.biopha.2018.08.159.

Mechanistic study on hesperidin improving inflammatory microenvironment after spinal cord injury through PI3K/AKT/NF- κ B signaling pathway

Ye Lei, You Tao

(Dept of Orthopedics, Anhui Medical University Affiliated Provincial Hospital, Hefei 230001)

Abstract Objective To explore the mechanism of hesperidin on hindlimb motor function in mice with spinal cord injury (SCI). **Methods** Oxygen glucose deprivation (OGD) was used to induce SCI in PC12 neuronal cells. CCK-8 assay determined the optimal hesperidin concentration (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 mmol/L) for subsequent experiments after 24 h treatment. PC12 cells were divided into Control group, OGD group and Hesperidin (30 mmol/L) + OGD groups. Hoechst staining assessed apoptosis; Western blot (WB), qPCR and immunofluorescence (IF) detected the expression of iNOS, CD206 and TNF- α . Flow cytometry measured apoptosis rates, and WB examined the impact of hesperidin on PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT, and NF- κ B expression. Forty-five healthy male C57BL/6 mice were randomly divided into Sham group, Sci group and Hesperidin groups. Sham and Sci groups received 0.1 mL PBS, while the Hesperidin group received 0.1 mL hesperidin. After modeling, iNOS, CD206, and TNF- α expression levels, spinal cord cavitation, and hindlimb motor function were evaluated. **Results**

Hesperidin at 10 - 30 mmol/L for 24 h did not significantly affect PC12 cell activity. Hoechst staining showed reduced apoptosis in PC12 cells after 24 h of 30 mmol/L hesperidin treatment. Compared to the OGD group, Hesperidin + OGD group had decreased mRNA and protein expression of inflammatory factors (iNOS and TNF- α) and increased expression of the anti-inflammatory factor (CD206). Hesperidin treatment inhibited PI3K/AKT/NF- κ B pathway activation, with similar results in mouse experiments. Compared to Sci group, Hesperidin group had reduced spinal cord cavitation area and improved hindlimb motor function. **Conclusion** Hesperidin may improve hindlimb motor function in mice with SCI by downregulating the phosphorylation level of the PI3K/AKT/NF- κ B pathway, inhibiting inflammatory factor release, promoting anti-inflammatory factor release, regulating the inflammatory microenvironment after SCI, and suppressing the acute inflammatory response.

Key words spinal cord injury; hesperidin; inflammatory microenvironment; PI3K/AKT/NF- κ B; oxygen glucose deprivation; PC12 neuronal cells

Fund programs Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2023AH040394); Research Project of Research Institute of Leading Medicine and Frontier Technology (No. 2023IHM01073)

Corresponding author You Tao, E-mail: youtao@ustc.edu.cn