

# 黄芩素可缓解蛛网膜下腔出血后神经元的铁死亡

朱婷<sup>1</sup>, 岳婷婷<sup>2</sup>, 崔悦<sup>1</sup>, 鲁悦<sup>2</sup>, 李伟<sup>1,2</sup>, 杭春华<sup>1,2</sup>

<https://doi.org/10.12307/2024.731>

投稿日期: 2023-09-04

采用日期: 2023-11-17

修回日期: 2023-12-11

在线日期: 2023-12-25

中图分类号:

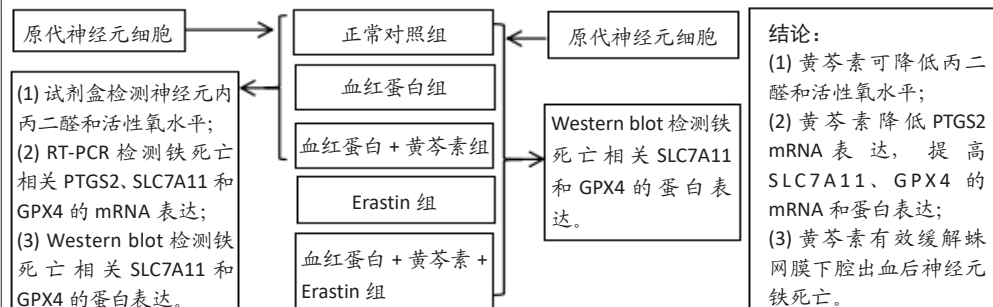
R459.9; R318; R966

文章编号:

2095-4344(2025)01-00052-06

文献标识码: B

## 文章快速阅读: 黄芩素对蛛网膜下腔出血后神经元铁死亡的影响及机制



## 文题释义:

**蛛网膜下腔出血:**是指脑底部或脑表面的病变血管破裂,血液直接流入蛛网膜下腔,主要病因是颅内动脉瘤破裂。

**铁死亡:**是一种新型的细胞程序性死亡方式,有别于细胞凋亡、细胞坏死、细胞自噬,主要机制是细胞内铁累积,催化细胞膜上高表达的不饱和脂肪酸,引起脂质过氧化,从而诱导细胞死亡。

**黄芩素:**是中药黄芩中提取的黄酮类化合物,具有抗氧化、抗炎、抗癌、抗糖尿病、抗病毒和神经保护等作用,其脂溶性较好,可通过胃肠道吸收,进入血液参与体循环,从而进入血脑屏障发挥药效。

## 摘要

**背景:**铁死亡是一种区别于凋亡、坏死等新型细胞程序性死亡的方式,主要由累积的脂质过氧化引起,已被证实参与蛛网膜下腔出血后的病理过程。黄芩素是一种铁螯合剂,能够抑制脂质过氧化反应,但其在蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中缓解神经元铁死亡的作用仍未明确。

**目的:**探讨黄芩素治疗蛛网膜下腔出血后对神经元铁死亡的影响及机制。

**方法:**提取孕16~17 d C57BL/6L胎鼠大脑皮质神经元细胞,运用血红蛋白刺激原代神经元模拟体外蛛网膜下腔出血模型。采用CCK-8法检测5, 15, 25, 50, 100  $\mu\text{mol/L}$ 黄芩素作用24 h后原代神经元细胞的活力,确定黄芩素的最适浓度。然后将原代神经元细胞分为对照组、血红蛋白组、血红蛋白+黄芩素组,利用试剂盒检测细胞内活性氧和丙二醛水平,RT-PCR检测铁死亡相关标记物PTGS2、SLC7A11、谷胱甘肽过氧化物酶4的mRNA表达;进一步将原代神经元细胞分为对照组、SLC7A11抑制剂Erastin组、血红蛋白组、血红蛋白+黄芩素组、血红蛋白+黄芩素+Erastin组,Western blot检测铁死亡相关标记物SLC7A11和谷胱甘肽过氧化物酶4的蛋白表达。

**结果与结论:**①选取25  $\mu\text{mol/L}$ 黄芩素作为后续实验浓度;②与血红蛋白组相比,血红蛋白+黄芩素组丙二醛和活性氧水平显著下降( $P < 0.05$ );③与血红蛋白组相比,血红蛋白+黄芩素组PTGS2的mRNA表达显著下降,SLC7A11和谷胱甘肽过氧化物酶4的mRNA表达显著升高( $P < 0.0001$ );④SLC7A11抑制剂Erastin能在一定程度上逆转黄芩素改善的铁死亡作用( $P < 0.05$ );⑤结果表明,黄芩素可通过SLC7A11/GPX4通路缓解蛛网膜下腔出血后神经元的铁死亡。

**关键词:**蛛网膜下腔出血;黄芩素;铁死亡;神经元;Erastin;小鼠

## Baicalein mitigates ferroptosis of neurons after subarachnoid hemorrhage

Zhu Ting<sup>1</sup>, Yue Tingting<sup>2</sup>, Cui Yue<sup>1</sup>, Lu Yue<sup>2</sup>, Li Wei<sup>1,2</sup>, Hang Chunhua<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Nanjing Drum Tower Hospital Clinical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China; <sup>2</sup>Department of Neurosurgery, Nanjing Drum Tower Hospital Affiliated to Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Zhu Ting, Master candidate, Nanjing Drum Tower Hospital Clinical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

**Corresponding author:** Hang Chunhua, MD, Chief physician, Professor, Nanjing Drum Tower Hospital Clinical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China; Department of Neurosurgery, Nanjing Drum Tower Hospital Affiliated to Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** Ferroptosis is a mode of programmed cell death distinct from apoptosis, necrosis, and other novel cellular deaths, which occurs mainly due to accumulated lipid peroxidation. Ferroptosis has been shown to be involved in the pathological process following subarachnoid hemorrhage. Baicalein, serving as an adept sequestered of iron, evinces its prowess by quelling lipid peroxidative cascades. Nonetheless, the enigma lingers as to whether baicalein possesses the capacity to ameliorate neuronal ferroptosis, elicited in the wake of early brain injury after subarachnoid hemorrhage.

<sup>1</sup>南京中医药大学鼓楼临床医学院, 江苏省南京市 210008; <sup>2</sup>南京大学医学院附属鼓楼医院神经外科, 江苏省南京市 210008

**第一作者:**朱婷,女,1999年生,汉族,南京中医药大学临床药学在读硕士,主要从事药物在神经系统疾病中的作用及机制研究。

**通讯作者:**杭春华,博士,主任医师,教授,南京中医药大学鼓楼临床医学院,江苏省南京市 210008;南京大学医学院附属鼓楼医院神经外科,江苏省南京市 210008

<https://orcid.org/0009-0008-3617-3583> (朱婷)

**基金资助:**国家自然科学基金资助项目(82130037, 81971122),项目负责人:杭春华

**引用本文:**朱婷,岳婷婷,崔悦,鲁悦,李伟,杭春华.黄芩素可缓解蛛网膜下腔出血后神经元的铁死亡[J].中国组织工程研究,2025,29(1):52-57.



**OBJECTIVE:** To investigate the effect and mechanism of baicalein on neuronal ferroptosis after subarachnoid hemorrhage.

**METHODS:** Primary neuronal cells were extracted from C57BL/6L fetal mice at 16–17 days of gestation. Hemoglobin was used to stimulate primary neuronal cells to simulate an *in vitro* subarachnoid hemorrhage model. The viability of primary neuronal cells treated with baicalein at concentrations of 5, 15, 25, 50, and 100  $\mu\text{mol/L}$  for 24 hours was detected by CCK-8 assay to determine the optimal concentration of baicalein. Primary neuronal cells were divided into control group, hemoglobin group, and hemoglobin+baicalein group. The levels of reactive oxygen species and malondialdehyde in cells were detected by kits. The mRNA expressions of ferroptosis-related markers PTGS2, SLC7A11, and glutathione peroxidase 4 were detected by RT-PCR. The primary neuronal cells were further divided into control group, SLC7A11 inhibitor Erastin group, hemoglobin group, hemoglobin+baicalein group, and hemoglobin+baicalein+Erastin group. The expression of the ferroptosis related markers SLC7A11 and glutathione peroxidase 4 was detected by western blot assay.

**RESULTS AND CONCLUSION:** (1) Baicalein (25  $\mu\text{mol/L}$ ) was selected as the following experimental concentration. (2) Compared with the hemoglobin group, the level of malondialdehyde and the level of reactive oxygen species were significantly decreased ( $P < 0.05$ ) in the hemoglobin+baicalein group. (3) Compared with the hemoglobin group, the mRNA expression of PTGS2 significantly decreased, and the mRNA expression of SLC7A11 and glutathione peroxidase 4 significantly increased ( $P < 0.0001$ ) in the hemoglobin+baicalein group. (4) SLC7A11 inhibitor Erastin could reverse the baicalin-improved ferroptosis effect to a certain extent ( $P < 0.05$ ). (5) The results showed that baicalein could alleviate the ferroptosis of neuronal cells after subarachnoid hemorrhage through the SLC7A11/GPX4 pathway.

**Key words:** subarachnoid hemorrhage; baicalein; ferroptosis; neuron; Erastin; mouse

**Funding:** National Natural Science Foundation of China, No. 82130037, 81971122 (to HCH)

**How to cite this article:** ZHU T, YUE TT, CUI Y, LU Y, LI W, HANG CH. Baicalein mitigates ferroptosis of neurons after subarachnoid hemorrhage. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(1):52–57.

## 0 引言 Introduction

蛛网膜下腔出血是高病死率和高致残率的三大脑血管疾病之一，导致其发生的主要原因是颅内动脉破裂<sup>[1]</sup>。蛛网膜下腔出血后机体发生一系列的病理生理反应，如血脑屏障破坏、氧化应激、炎症、神经元损伤和脑水肿等<sup>[2-4]</sup>。近年来，出现了一种叫铁死亡的新型细胞程序性死亡的形式，在蛛网膜下腔出血中可能起重要作用<sup>[5-7]</sup>。铁死亡是一种不同于细胞凋亡、细胞坏死和细胞自噬的铁依赖性死亡，主要是脂质过氧化物蓄积，导致细胞损伤和功能障碍<sup>[8-11]</sup>。虽然铁死亡的机制越发清楚，但在蛛网膜下腔出血中的研究仍处于起步阶段。溶质载体家族 SLC7A11 作为铁死亡最关键的调节因子之一，与谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 共同组成抗氧化防御系统，SLC7A11 下调可致细胞内胱氨酸水平降低和谷胱甘肽合成耗竭，间接抑制 GPX4 活性，继而导致活性氧和脂质过氧化物蓄积，最终诱导细胞发生铁死亡<sup>[12-13]</sup>。黄芩素是一种从黄芩中提取的天然黄酮类化合物，因具有抗氧化、抗炎、抗癌和神经保护等多方面的药理特性而受到关注<sup>[14-16]</sup>。研究证实，黄芩素是一种铁螯合剂，可调节细胞内铁稳态<sup>[17]</sup>，具有治疗蛛网膜下腔出血后铁死亡的巨大潜力，但黄芩素是否可通过 SLC7A11/GPX4 发挥抗蛛网膜下腔出血后铁死亡的作用，尚不得知。基于此，该实验旨在探讨黄芩素通过 SLC7A11/GPX4 缓解蛛网膜下腔出血后神经元铁死亡的潜在机制，进一步探究其神经保护作用。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**1.1 设计** 原代小鼠大脑皮质神经元细胞提取及体外细胞实验。

**1.2 时间及地点** 实验于 2022 年 12 月至 2023 年 6 月在南京大学医学院附属鼓楼医院中心实验室完成。

**1.3 材料**

**1.3.1 实验动物** 孕 16–17 d C57BL/6L 小鼠，SPF 级，

体质量 25–30 g，用于提取原代神经元细胞，购于斯贝福 (苏州) 生物技术有限公司，实验动物合格证号：SCXK(苏)2022-0006，实验动物使用许可证号：SYXK(苏)2019-0059。所有动物实验操作均严格遵循实验动物管理相关条例及保护准则，且通过南京大学医学院附属鼓楼医院伦理委员会的动物实验伦理审查 (批准号为 2023AE01027)。

**1.3.2 主要试剂** 1×Neurobasal、50× B27、100× GlutaMax、TrypLE、DMEM/F12、胎牛血清、青霉素–链霉素 (Gibco 公司)；D-Hank's 缓冲液、PBS 缓冲液 (BioChannel 公司)；SLC7A11/xCT 多克隆抗体 (#DF12509, Affinity 公司)；GPX4 单克隆抗体 (ab125066, Abcam 公司)；血红蛋白、 $\beta$ -Actin 抗体 (Sigma 公司)；鼠抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG (Cell Signaling Technology 公司)；黄芩素、SLC7A11 抑制剂 Erastin (MCE 公司)；多聚赖氨酸、CCK-8 试剂盒、DEPC 水、超级核酸酶、蛋白酶抑制剂、BCA 试剂盒、TBST、Western blot 一抗和二抗稀释液、RIPA、二甲基亚砷、丙二醛试剂盒、活性氧试剂盒 (碧云天生物科技公司)；PTGS2、SLC7A11、GPX4 的 mRNA 引物 (擎科生物)；PAGE 凝胶快速制备试剂盒、电泳蛋白分子量 marker、10×Tris/甘氨酸/SDS 电泳缓冲液、10×转膜缓冲液 (上海雅酶生物医药科技有限公司)；Millipore PVDF 膜 (0.22  $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$ )、5% 脱脂奶粉、RNA 提取试剂盒、HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR、ChamQ SYBR qPCR Master Mix、ECL (诺唯赞生物科技股份有限公司)。

**1.3.3 主要仪器** 动物解剖器械 (显微剪、显微镊、弯镊、烧杯)、动物解剖显微镜 (玉研仪器)；4  $^{\circ}\text{C}$  高速离心机、生物安全柜、细胞培养箱、酶标仪、超微量分光光度计、自动化 PCR 仪、实时荧光定量 PCR 仪器 (Thermo)；普通光学显微镜 (Olympus)；高压灭菌锅 (上海讯博)；恒温水浴锅 (上海跃进)；恒温金属浴 (杭州瑞诚)；Western blot 电泳仪、电泳槽 (Bio-Rad)；Thunder 荧光显微镜 (Leica)；曝光机 (上海天能)。

1.4 实验方法

1.4.1 神经元的提取及培养 孕 16–17 d C57BL/6L 小鼠吸入 CO<sub>2</sub> 麻醉后，开腹腔取出胎鼠，转移至提前预冷的 D-Hank's 缓冲液中，随后操作均在冰上进行。根据生理结构依次剥离头皮、颅骨、大脑，尽可能剥去血管和脑膜。将分离出的脑组织放入 60 cm<sup>2</sup> 培养皿中，加入 TrypLE，置于 37 °C 培养箱消化 10 min，用含有体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 终止消化，随后用 1 mL 枪头反复、缓慢吹打脑组织至无组织块，将细胞悬液过滤，1 500 r/min 离心 5 min，去除上清，加入无血清的 DMEM/F12 重悬，计数后按合适细胞密度接种于提前使用多聚赖氨酸包被好的孔板内，4 h 后更换为神经元专用培养基。在培养的第 3，5 天进行半换液，第 7 天全换液。

1.4.2 原代神经元培养基、血红蛋白及黄芩素溶液配制

- (1) 原代神经元培养基：1×Neurobasal、50×B27、100× GlutaMax 混合配制成完全培养基用于后续实验。
- (2) 血红蛋白溶液：称取适量血红蛋白粉末溶解于原代神经元培养基，使其终浓度为 25 μmol/L，配制后用于模拟体外蛛网膜下腔出血模型。
- (3) 黄芩素溶液：将 13.5 mg 黄芩素粉末溶于 1 mL 二甲基亚砜中，配成 50 mmol/L 的储存液，避光分装后 -20 °C 保存。

1.4.3 CCK-8 法检测细胞活力筛选黄芩素的最佳浓度 将原代神经元细胞制成 2×10<sup>7</sup> L<sup>-1</sup> 的细胞悬液，以每孔 200 μL 的体积种植于 96 孔板，培养 7 d，分为对照组、血红蛋白组和血红蛋白 + 黄芩素不同浓度组，每组设置 6 个复孔，另设空白孔（仅加培养基）为空白对照组。其中血红蛋白浓度为 25 μmol/L，黄芩素浓度分别为 5，15，25，50，100 μmol/L，黄芩素预处理 2 h 后加入血红蛋白共同培养 24 h，随后每孔按照 100 : 1 比例加入 20 μL CCK-8 工作液，孵育 2 h 后用酶标仪检测各组细胞 450 nm 处吸光度值。

1.4.4 试剂盒检测细胞内丙二醛水平 将原代神经元细胞制成 4×10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup> 的细胞悬液，以每孔 200 μL 的体积种植于 96 孔板，培养 7 d，分为对照组、血红蛋白组和血红蛋白 + 黄芩素组，每组设置 3 个复孔，其中血红蛋白浓度为 25 μmol/L，黄芩素浓度为 25 μmol/L，血红蛋白 + 黄芩素组先用黄芩素预处理 2 h，然后加入血红蛋白共同作用 24 h。收集细胞，建立标准曲线，加入提前配置的丙二醛检测工作液，混匀，100 °C 金属浴加热 15 min，冷却至室温，1 000×g 室温离心 10 min，取 200 μL 上清液进入 96 孔板，用酶标仪在 532 nm 波长处测定吸光度值。

1.4.5 试剂盒检测细胞内活性氧水平 将原代神经元细胞制成 2×10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup> 的细胞悬液，以每孔 200 μL 的体积种植于 96 孔板，培养 7 d，分为对照组、血红蛋白组和血红蛋白 + 黄芩素组，每组设置 3 个复孔，其中血红蛋白浓度

为 25 μmol/L，黄芩素浓度为 25 μmol/L，血红蛋白 + 黄芩素组先用黄芩素预处理 2 h，然后加入血红蛋白共同作用 24 h，检测活性氧水平。按照 1 : 1 000 无血清培养液稀释 DCFH-DA，使终浓度为 10 μmol/L。去除细胞培养液，加入 100 μL 稀释好的 DCFH-DA，37 °C 细胞培养箱内孵育 20 min，用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次，去除未进入细胞内的 DCFH-DA，激发光波长和发射光波长分别为 488 nm、525 nm，在荧光显微镜下观察并拍照，Image J 软件分析平均荧光强度。

1.4.6 RT-PCR 检测 PTGS2、SLC7A11、GPX4 的 mRNA 表达 将原代神经元细胞制成 8×10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup> 的细胞悬液，以每孔 1 mL 的体积种植于 12 孔板，培养 7 d，分为对照组、血红蛋白组和血红蛋白 + 黄芩素组，每组设置 3 个复孔，其中血红蛋白浓度为 25 μmol/L，黄芩素浓度为 25 μmol/L，血红蛋白 + 黄芩素组先用黄芩素预处理 2 h，然后加入血红蛋白共同作用 24 h，用 RNA 提取试剂盒提取每组细胞总 RNA，测浓度后，反转录合成 cDNA，按照试剂盒说明书采用 SYBR Green 染料法荧光定量 PCR，以 GAPDH 作为内参基因，以 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法计算 PTGS2、SLC7A11、GPX4 的 mRNA 表达水平。引物序列见表 1。

表 1 | 引物序列  
Table 1 | Primer sequences

| 基因名称      | 引物序列 (5'-3')                   |
|-----------|--------------------------------|
| SLC7A11-F | GGC ACC GTC ATC GGA TCA G      |
| SLC7A11-R | CTC CAC AGG CAG ACC AGA AAA    |
| GPX4-F    | GAT GGA GCC CAT TCC TGA ACC    |
| GPX4-R    | CCC TGT ACT TAT CCA GGC AGA    |
| PTGS2-F   | TTC AAC ACA CTC TAT CAC TGG C  |
| PTGS2-R   | AGA AGC GTT TGC GGT ACT CAT    |
| GAPDH-F   | AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG    |
| GAPDH-R   | TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA |

表注：GPX4 为谷胱甘肽过氧化物酶 4。

1.4.7 CCK-8 法检测细胞活力筛选 Erastin 的最佳浓度 将原代神经元细胞制成 2×10<sup>7</sup> L<sup>-1</sup> 的细胞悬液，以每孔 200 μL 的体积种植于 96 孔板，培养 7 d，分为对照组、血红蛋白组和血红蛋白 + Erastin 不同浓度组，每组设置 3 个复孔，另设空白孔（仅加培养基）为空白对照组。其中血红蛋白浓度为 25 μmol/L，Erastin 浓度分别为 0.5，1.0，1.5，2.0，2.5 μmol/L，Erastin 与血红蛋白共同作用 24 h，随后每孔按照 100 : 1 加入 20 μL CCK-8 工作液，孵育 2 h 后用酶标仪检测各组细胞 450 nm 处吸光度值。

1.4.8 Western blot 检测蛋白表达水平 将原代神经元细胞制成 8×10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup> 的细胞悬液，以每孔 2 mL 的体积种植于 6 孔板，培养 7 d，分为对照组、Erastin 组、血红蛋白组、血红蛋白 + 黄芩素组、血红蛋白 + 黄芩素 + Erastin 组，每组设置 3 个复孔，其中血红蛋白浓度为 25 μmol/L，黄芩素浓度为 25 μmol/L，Erastin 浓度为 1.5 μmol/L，与血红

蛋白连用 Erastin 浓度为 0.5  $\mu\text{mol/L}$ ，血红蛋白 + 黄芩素组先用黄芩素预处理 2 h，然后加入血红蛋白共同作用 24 h，血红蛋白 + 黄芩素 + Erastin 组先用黄芩素预处理 2 h，然后加入血红蛋白和 Erastin 共同作用 24 h。各组干预结束后，每孔加入 RIPA、蛋白酶抑制剂和超级核酸酶混合液，裂解提取细胞总蛋白，用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白加热变性，以 30–50  $\mu\text{g}$  的质量上样，电泳、转膜后用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h，分别加入以 1 : 1 000 稀释的 SLC7A11 一抗和 1 : 5 000 稀释的 GPX4 一抗，孵育过夜，选择一抗相应种属的二抗，室温摇床孵育 1 h，ECL 化学发光显影，Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

1.5 主要观察指标 ①黄芩素对原代神经元细胞活性的影响；②黄芩素对原代神经元细胞丙二醛水平的影响；③黄芩素对原代神经元细胞活性氧水平的影响；④黄芩素对 SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达的影响；⑤黄芩素对 PTGS2、SLC7A11 和 GPX4 mRNA 表达的影响。

1.6 统计学分析 采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析，数据为计量资料，以  $\bar{x} \pm s$  表示，采用单因素方差分析 (ANOVA) 和  $t$  检验进行统计学处理，其中两组间对比用  $t$  检验，3 组或 3 组以上对比用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有显著性意义。文章的统计学方法经南京大学医学院附属鼓楼医院生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 CCK-8 检测细胞活力 据课题组以往多次重复实验可知，血红蛋白刺激原代神经元细胞 24 h 后的  $\text{IC}_{50}$  为 25  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[18-19]</sup>。用不同浓度黄芩素 (5, 15, 25, 50, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) 预处理原代神经元细胞 2 h 后与 25  $\mu\text{mol/L}$  血红蛋白共同作用 24 h，检测细胞活力。与血红蛋白组相比，25  $\mu\text{mol/L}$  黄芩素作用后的细胞存活率明显升高，差异有非常显著性意义 ( $P < 0.000\ 1$ )，见图 1。因此，后续选用 25  $\mu\text{mol/L}$  黄芩素作为药物治疗浓度。

2.2 丙二醛水平 与对照组相比，血红蛋白组丙二醛水平明显升高，差异有非常显著性意义 ( $P < 0.001$ )，与血红蛋白组相比，血红蛋白 + 黄芩素组丙二醛水平明显降低，差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )，见图 2，表明黄芩素可减少神经元损伤后升高的丙二醛水平。

2.3 活性氧水平 绿色荧光代表神经元生成的活性氧水平。与对照组相比，血红蛋白组的荧光强度明显增高，提示血红蛋白刺激 24 h 后神经元产生了大量的活性氧，血红蛋白 + 黄芩素组相较血红蛋白组荧光强度明显减弱。根据荧光定量分析结果显示，黄芩素可减少神经元损伤后产生的活性氧，差异有非常显著性意义 ( $P < 0.01$ )，见图 3。

2.4 PTGS2、SLC7A11 和 GPX4 mRNA 表达 与血红蛋白组相比，血红蛋白 + 黄芩素组的 PTGS2 mRNA 表达显著下降，

SLC7A11、GPX4 mRNA 表达显著升高，差异均有非常显著性意义 ( $P < 0.000\ 1$ )，见表 2。以上结果显示，黄芩素可通过调控以上基因表达以保护神经元。

表 2 | 各组原代神经元铁死亡相关蛋白的 mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )  
Table 2 | mRNA expression of ferroptosis-related proteins in primary neurons of each group

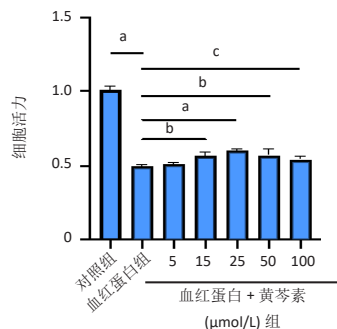
| 组别          | PTGS2                  | SLC7A11                | 谷胱甘肽过氧化物酶 4            |
|-------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 对照组         | 0.23±0.04              | 1.27±0.05              | 1.35±0.07              |
| 血红蛋白组       | 1.34±0.04 <sup>a</sup> | 0.29±0.06 <sup>a</sup> | 0.18±0.04 <sup>a</sup> |
| 血红蛋白 + 黄芩素组 | 0.37±0.06 <sup>b</sup> | 0.85±0.05 <sup>b</sup> | 0.77±0.08 <sup>b</sup> |

表注：与对照组相比，<sup>a</sup> $P < 0.000\ 1$ ；与血红蛋白组相比，<sup>b</sup> $P < 0.000\ 1$ 。

2.5 SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达 与对照组相比，血红蛋白组 SLC7A11 和 GPX4 的蛋白表达水平均显著降低，差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )，见图 4A, B。随后，为了验证黄芩素是否通过 SLC7A11/GPX4 通路来发挥作用，引入了 SLC7A11 抑制剂 Erastin。通过 CCK-8 实验得出，Erastin 作用后原代神经元细胞的活性被抑制，且抑制作用呈浓度依赖性，Erastin 作用原代神经元细胞的半抑制浓度为 1.5  $\mu\text{mol/L}$ ，与血红蛋白连用后的半抑制浓度为 0.5  $\mu\text{mol/L}$ ，见图 4C。将各药物作用于原代神经元细胞 24 h 后检测 SLC7A11 和 GPX4 的蛋白表达水平，与血红蛋白组和 Erastin 组相比，血红蛋白 + 黄芩素组 SLC7A11 和 GPX4 的蛋白表达水平均显著升高 ( $P < 0.05$ )；与血红蛋白 + 黄芩素组相比，血红蛋白 + 黄芩素 + Erastin 组 SLC7A11 和 GPX4 的蛋白表达水平均显著降低 ( $P < 0.05$ )，见图 4D, E。黄芩素通过 SLC7A11/GPX4 通路缓解了由血红蛋白诱导的铁死亡，提示黄芩素具有治疗蛛网膜下腔出血后神经元铁死亡的作用。

3 讨论 Discussion

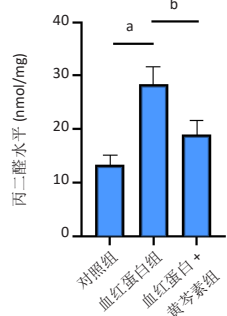
蛛网膜下腔出血发生时，患者脑脊液和皮质中的铁含量显著增多<sup>[20]</sup>，蓄积的铁通过芬顿反应和过氧化氢反应形成剧毒羟基，导致活性氧和脂质过氧化物的累积，引起细胞发生铁死亡<sup>[21-22]</sup>。既往研究表明，丙二醛是脂质过氧化的产物，其含量的多少与铁死亡呈正相关<sup>[22]</sup>。在该研究中，首先观察到血红蛋白刺激后原代神经元细胞中丙二醛水平显著增加，活性氧水平升高。引起脂质过氧化物蓄积的主要原因之一是 xCT- 谷胱甘肽 -GPX4 的抗氧化防御系统失活<sup>[23-24]</sup>，GPX4 是清除活性氧所必需的，而抑制 SLC7A11(xCT 的轻链) 可减弱谷胱甘肽水平和 GPX4 活性<sup>[25]</sup>。为了进一步确定血红蛋白诱导神经元发生铁死亡与 SLC7A11/ GPX4 通路是否有关，该研究通过检测铁死亡相关蛋白 SLC7A11 和 GPX4 的表达水平，发现在血红蛋白作用下铁死亡相关蛋白 SLC7A11 和 GPX4 表达水平均显著降低；检测铁死亡相关基因 PTGS2、SLC7A11 和 GPX4 的



图注: <sup>a</sup> $P < 0.0001$ , <sup>b</sup> $P < 0.001$ , <sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

图 1 | 不同浓度黄芩素作用下原代神经元的存活率

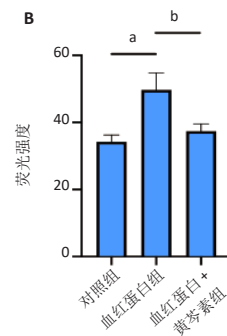
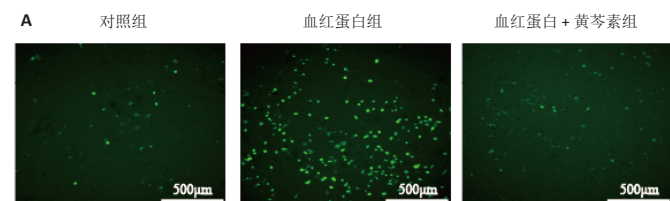
Figure 1 | Survival rate of primary neurons exposed to different concentrations of baicalein



图注: <sup>a</sup> $P < 0.001$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

图 2 | 各组原代神经元的丙二醛水平

Figure 2 | Malondialdehyde levels in primary neurons of each group



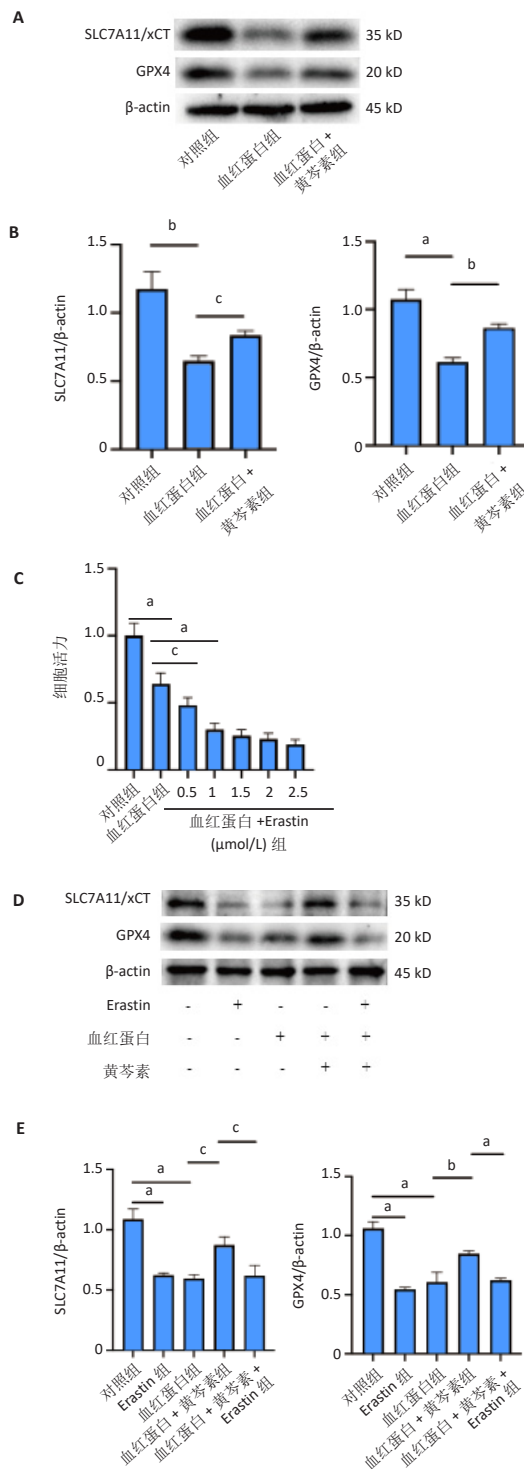
图注: 图 A 为细胞活性氧荧光图; B 为荧光强弱分析。 <sup>a</sup> $P < 0.005$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

图 3 | 各组原代神经元的活性氧水平

Figure 3 | Reactive oxygen species expression levels in primary neurons of each group

表达,发现 PTGS2 的 mRNA 表达显著上升,SLC7A11 和 GPX4 的 mRNA 表达显著下降。这提示在血红蛋白的作用下,神经元细胞发生铁死亡,与前人研究相一致<sup>[26-27]</sup>。

黄芩素作为一种铁螯合剂,有助于抑制脂质过氧化,在铁死亡发生时起核心作用<sup>[28-29]</sup>。该研究发现与血红蛋白组相比,黄芩素组的丙二醛和活性氧水平显著降低,SLC7A11 和 GPX4 的蛋白表达水平明显升高,而 PTGS2、SLC7A11 和 GPX4 mRNA 表达水平的逆转也与使用黄芩素有关。为了确定黄芩素是通过 SLC7A11/GPX4 通路缓解神经元细胞铁死亡,使用了 SLC7A11 抑制剂 Erastin,结果印证了作者的猜想,发现 Erastin 在一定程度上可降低 GPX4



图注: 图 A, B 为黄芩素对铁死亡蛋白 SLC7A11 和 GPX4 表达的影响; C 为 CCK-8 检测 Erastin 对神经元活性的影响; D, E 为 Erastin 对铁死亡蛋白 SLC7A11 和 GPX4 表达的影响。 <sup>a</sup> $P < 0.0001$ , <sup>b</sup> $P < 0.001$ , <sup>c</sup> $P < 0.05$ 。GPX4: 谷胱甘肽过氧化物酶 4。

图 4 | 黄芩素对铁死亡蛋白 SLC7A11 和 GPX4 的作用

Figure 4 | Effect of baicalein on ferroptosis proteins SLC7A11 and GPX4

的蛋白表达水平。基于以上实验,认为黄芩素可以调节铁死亡途径中关键成分的表达和活性,如脂质修复酶 GPX4 和胱氨酸 / 谷氨酸反向转运体 SLC7A11。通过这些相互作用,黄芩素作为铁死亡的潜在治疗药物,为蛛网膜下腔出血的治疗提供了新的途径。

综上所述,通过了解黄芩素在减轻铁死亡诱导细胞死亡中的作用,对临床治疗蛛网膜下腔出血具有一定意义。该实验还存在一些不足之处,如未进行体内实验、未从亚显微结构去观察铁死亡情况等。黄芩素是公认的脂氧合酶特异性抑制剂,可通过抑制 12/15 脂氧合酶导致神经元细胞死亡的途径,抑制脂质过氧化反应<sup>[30]</sup>,但其是否可通过其他通路来缓解蛛网膜下腔出血后神经元铁死亡还未知,故具体机制有待后续进一步研究。

**作者贡献:** 朱婷负责实验实施、论文撰写,朱婷、岳婷婷负责实验数据分析处理,朱婷、崔悦负责指标检测,李伟、鲁悦负责数据和文章的校对,杭春华负责实验设计。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

**版权转让:** 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

**出版规范:** 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》;文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重;文章经小同行外审专家双盲审稿,同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

## 4 参考文献 References

- [1] CLAASSEN J, PARK S. Spontaneous subarachnoid haemorrhage. *Lancet*. 2022;400(10355):846-862.
- [2] ZENG H, CHEN H, LI M, et al. Autophagy protein NRBF2 attenuates endoplasmic reticulum stress-associated neuroinflammation and oxidative stress via promoting autophagosome maturation by interacting with Rab7 after SAH. *J Neuroinflammation*. 2021;18(1):210.
- [3] RASS V, HELBOK R. Early Brain Injury After Poor-Grade Subarachnoid Hemorrhage. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2019;19(10):78.
- [4] NEIFERT SN, CHAPMAN EK, MARTINI ML, et al. Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: the Last Decade. *Transl Stroke Res*. 2021;12(3):428-446.
- [5] LI Y, LIU Y, WU P, et al. Inhibition of Ferroptosis Alleviates Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage In Vitro and In Vivo via Reduction of Lipid Peroxidation. *Cell Mol Neurobiol*. 2021;41(2):263-278.
- [6] HUANG Y, WU H, HU Y, et al. Puerarin Attenuates Oxidative Stress and Ferroptosis via AMPK/PGC1 $\alpha$ /Nrf2 Pathway after Subarachnoid Hemorrhage in Rats. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(7):1259.
- [7] LIANG Y, DENG Y, ZHAO J, et al. Ferritinophagy is Involved in Experimental Subarachnoid Hemorrhage-Induced Neuronal Ferroptosis. *Neurochem Res*. 2022; 47(3):692-700.
- [8] JIANG X, STOCKWELL BR, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021;22(4):266-282.
- [9] CHEN X, KANG R, KROEMER G, et al. Ferroptosis in infection, inflammation, and immunity. *J Exp Med*. 2021;218(6):e20210518.
- [10] TANG D, KROEMER G. Ferroptosis. *Curr Biol*. 2020;30(21):R1292-R1297.
- [11] LI QS, JIA YJ. Ferroptosis: a critical player and potential therapeutic target in traumatic brain injury and spinal cord injury. *Neural Regen Res*. 2023;18(3):506-512.
- [12] KOPPULA P, ZHANG Y, ZHUANG L, et al. Amino acid transporter SLC7A11/xCT at the crossroads of regulating redox homeostasis and nutrient dependency of cancer. *Cancer Commun (Lond)*. 2018;38(1):12.
- [13] YANG WS, SRIRAMARATNAM R, WELSCH ME, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*. 2014;156(1-2):317-331.
- [14] DINDA B, DINDA S, DASSHARMA S, et al. Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone, baicalein against inflammatory disorders. *Eur J Med Chem*. 2017;131:68-80.
- [15] LIU BY, LI L, LIU GL, et al. Baicalein attenuates cardiac hypertrophy in mice via suppressing oxidative stress and activating autophagy in cardiomyocytes. *Acta Pharmacol Sin*. 2021;42(5):701-714.
- [16] CHEN X, ZHOU Y, WANG S, et al. Mechanism of Baicalein in Brain Injury After Intracerebral Hemorrhage by Inhibiting the ROS/NLRP3 Inflammasome Pathway. *Inflammation*. 2022;45(2):590-602.
- [17] MLADĚNKA P, MACÁKOVÁ K, FILIPSKÝ T, et al. In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *J Inorg Biochem*. 2011;105(5):693-701.
- [18] ZHOU Y, TAO T, LIU G, et al. TRAF3 mediates neuronal apoptosis in early brain injury following subarachnoid hemorrhage via targeting TAK1-dependent MAPKs and NF- $\kappa$ B pathways. *Cell Death Dis*. 2021;12(1):10.
- [19] LIU GJ, TAO T, WANG H, et al. Functions of resolvin D1-ALX/FPR2 receptor interaction in the hemoglobin-induced microglial inflammatory response and neuronal injury. *J Neuroinflammation*. 2020;17(1):239.
- [20] SUZUKI H, MURAMATSU M, TANAKA K, et al. Cerebrospinal fluid ferritin in chronic hydrocephalus after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurol*. 2006;253(9):1170-1176.
- [21] HUANG S, LI S, FENG H, et al. Iron Metabolism Disorders for Cognitive Dysfunction After Mild Traumatic Brain Injury. *Front Neurosci*. 2021; 15:587197.
- [22] LIU Z, ZHOU Z, AI P, et al. Astragaloside IV attenuates ferroptosis after subarachnoid hemorrhage via Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Front Pharmacol*. 2022;13:924826.
- [23] KOPPULA P, ZHUANG L, GAN B. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy. *Protein Cell*. 2021; 12(8):599-620.
- [24] FRIEDMANN ANGELI JP, SCHNEIDER M, PRONETH B, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat Cell Biol*. 2014;16(12):1180-1191.
- [25] YE Y, CHEN A, LI L, et al. Repression of the antiporter SLC7A11/glutathione/glutathione peroxidase 4 axis drives ferroptosis of vascular smooth muscle cells to facilitate vascular calcification. *Kidney Int*. 2022;102(6):1259-1275.
- [26] LIU C, HE P, GUO Y, et al. Taurine attenuates neuronal ferroptosis by regulating GABAB/AKT/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin pathway after subarachnoid hemorrhage. *Free Radic Biol Med*. 2022;193(Pt 2):795-807.
- [27] GAO SQ, LIU JQ, HAN YL, et al. Neuroprotective role of glutathione peroxidase 4 in experimental subarachnoid hemorrhage models. *Life Sci*. 2020;257:118050.
- [28] PEREZ CA, WEI Y, GUO M. Iron-binding and anti-Fenton properties of baicalein and baicalin. *J Inorg Biochem*. 2009;103(3):326-332.
- [29] XIE Y, SONG X, SUN X, et al. Identification of baicalein as a ferroptosis inhibitor by natural product library screening. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 73(4):775-780.
- [30] PROBST L, DÄCHERT J, SCHENK B, et al. Lipoyxygenase inhibitors protect acute lymphoblastic leukemia cells from ferroptotic cell death. *Biochem Pharmacol*. 2017;140:41-52.

(责任编辑: MZH, ZN, QY, ZM)