

大鼠原代神经元中依达拉奉对糖氧剥夺损伤的保护及对 ROS/TXNIP/NLRP3 通路的影响*

吴键¹ 柳华² 张云茜³ 罗丽华³ 杨志秀³ 尚正良³ 刘姚³ 隆昱洲³

(1. 云南大学附属医院·云南省第二人民医院·云南省眼科医院神经外科, 云南 昆明 650021;

2. 成都市第三人民医院神经内科, 四川 成都 610014;

3. 云南大学附属医院·云南省第二人民医院·云南省眼科医院神经内科, 云南 昆明 650021)

【摘要】 目的 探讨依达拉奉后处理对神经元糖氧剥夺损伤的保护作用及对活性氧(ROS)/硫氧还蛋白结合蛋白(TXNIP)/NOD 样受体相关蛋白 3(NOD-like receptor associated protein 3, NLRP3)信号通路的影响。方法 培养新生 SD 大鼠皮质神经元,经免疫荧光染色鉴定后随机分为神经元组、依达拉奉组、糖氧剥夺组、糖氧剥夺+依达拉奉组 4 组。各组神经元在完成处理后以 CCK-8 试剂盒检测神经活力;以细胞凋亡试剂盒检测神经元凋亡情况;以 ELISA 试剂盒检测神经元 ROS 产生情况;以蛋白免疫印迹法检测 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路相关蛋白的表达水平。结果 神经元缺糖缺氧后细胞活力显著降低,依达拉奉处理后又显著上升,差异有统计学意义($P<0.01$);糖氧剥夺后,神经元凋亡水平、ROS 含量、ROS/TXNIP/NLRP3 通路相关 IL-1 β 、TXNIP、IL-18、Caspase-1、ASC 和 NLRP3 蛋白表达水平升高,依达拉奉处理后又显著下降,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 依达拉奉对神经元糖氧剥夺损伤具有保护作用,可能与其对 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路的抑制有关。

【关键词】 依达拉奉;糖氧剥夺;脑卒中;ROS;TXNIP;NLRP3

【中图分类号】 R743.32 **【文献标志码】** A **DOI:**10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2022. 09. 006

Effects of edaravone on protecting glucose-oxygen deprivation injury and the reactive oxygen species/thioredoxin interacting protein/NOD-like receptor associated protein 3 pathway in rat primary neurons

WU Jian¹, LIU Hua², ZHANG Yunqian³, LUO Lihua³, YANG Zhixiu³, SHANG Zhengliang³, LIU Yao³, LONG Yuzhou³

(1. Department of Neurosurgery, The Affiliated Hospital of Yunnan University, The Second People's Hospital of Yunnan Province, Yunnan Eye Hospital, Kunming 650021, China;

2. Department of Neurology, The Third People's Hospital of Chengdu, Chengdu 610014, China;

3. Department of Neurology, The Affiliated Hospital of Yunnan University, The Second People's Hospital of Yunnan Province·Yunnan Eye Hospital, Kunming 650021, China)

【Abstract】 Objective To explore the protective effects of edaravone postconditioning on cerebral hypoxia injury in rats and its effect on the reactive oxygen species (ROS)/thioredoxin interacting protein (TXNIP)/NOD-like receptor-associated protein3 (NLRP3) signaling pathway. **Methods** Neonatal SD rat cortical neurons were cultured and identified by immunofluorescence staining and randomly divided into 4 groups: neuron group, edaravone group, glucose-oxygen deprivation group, glucose-oxygen deprivation + edaravone group. Neurons in each group were tested for neuronal viability by CCK-8 kit after completion of treatment; neuronal apoptosis by apoptosis kit; neuronal ROS production by ELISA kit; and the expression levels of neuronal proteins by Western blotting. **Results** The cell viability was significantly decreased after glucose deprivation and hypoxia, and increased significantly after edaravone treatment, and the difference was statistically significant ($P<0.01$); after glucose deprivation, the neuronal apoptosis level, ROS content, IL-1 β protein expression level, TXNIP protein expression level, IL-18 protein expression level, caspase-1 protein expression

基金项目:云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项资金[2019FE001(-258)]

通信作者:隆昱洲,副主任医师,E-mail:lyz109@126.com

引用本文:吴键,柳华,张云茜,等.大鼠原代神经元中依达拉奉对糖氧剥夺损伤的保护及对 ROS/TXNIP/NLRP3 通路的影响[J].西部医学,

level, ASC protein expression level and NLRP3 protein expression level were significantly increased, and decreased significantly after edaravone treatment, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** Edaravone has a neuronal protective effect, which may be related to the inhibition of the ROS/TXNIP/NLRP3 signaling pathway.

【Key words】 Edaravone; Glucose and oxygen deprivation; Stroke; ROS; TXNIP; NLRP3

脑卒中是一种常见的具有高致残率和高死亡率的疾病,其中主要为缺血性脑卒中(Ischemic stroke, IS),其发生率和死亡率分别为 0.247% 和 0.115%^[1]。在我国,IS 发生后 1 年内,病死率高达 11.4%~15.4%^[2]。目前,治疗缺血性脑卒中安全有效的方法是 3 h 内使用重组人组织型纤溶酶原激活物(Recombinant tissue plasminogen activator, rt-PA)进行溶栓治疗^[3]。然而,受限于极窄的溶栓时间窗,在我国仅有 2.4% 的患者进行了有效的溶栓治疗,远低于美国的 25.1%^[4]。脑缺血损伤后,产生大量的氧化自由基,进一步导致神经元凋亡、脑水肿、脑梗死。研究表明,依达拉奉作为一种氧化自由基清除剂,在缺血性脑卒中能够抑制氧化自由基导致的损伤,发挥神经元保护作用^[3-4]。此外,在创伤性脑外伤模型中发现,依达拉奉能够降低氧化自由基水平并减少损伤体积^[5]。硫氧还蛋白相互作用蛋白(Thioredoxin-interacting protein, TXNIP)是细胞内源性氧化应激和炎症调节因子,在缺血性疾病中发挥重要作用。研究表明,活性氧(Reactive oxygen species, ROS)通过 ROS 敏感的 TXNIP 激活 NLRP3(NLR Family Pyrin Domain Containing 3)炎症小体^[6-7]。NLRP3/ASC/caspase-1 信号通路激活后,细胞合成并释放 IL-1 β , IL-18 导致神经元和胶质细胞凋亡和焦亡^[8-9]。因此,本研究认为依达拉奉可通过 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路降低缺血性脑卒中神经元的损伤。本研究通过体外培养的 SD 大鼠皮质神经元来研究依达拉奉对缺氧神经元的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料 健康出生 24 h 内新生 SD 大鼠 16 只,购自昆明医科大学实验动物中心。所有动物护理和实验均按照中华人民共和国实验动物护理和使用科学技术委员会进行,所有动物实验经云南大学附属医院伦理委员会批准通过(2019043)。主要试剂:依达拉奉、PBS 购自 sigma; Cell Counting Kit-8(CCK-8)、流式凋亡检测试剂盒购自同仁化学研究所; NeuN 抗体购自 Abcam 公司, NLRP3 (Bioss, 1:1000)、ASC (Bioss, 1:1000)、TXNIP (Abcam, 1:1000)、caspase-1 (Bioss, 1:1000)、IL-18 (Bioss, 1:1000)、IL-1 β (Bioss, 1:1000) 一抗抗体购自 KPL 公司。电泳仪及电泳槽 (E-C Apparatus Corporation, 美国); 全波长酶标仪、

Western blot 转膜仪、Cytation5 荧光成像系统和 Gel Doc 凝胶成像仪 (Bio-Rad, 美国); 流式细胞仪 (Beckman Coulter, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 SD 大鼠离体皮质神经元的培养 新生 SD 大鼠用 75% 酒精浸泡消毒皮肤后,迅速断头取脑。剥离出整个脑组织放入有 10 mL 解剖液 (DMEM/F12 基础培养基+1% 双抗) 的培养皿中,体式显微镜下找到脑膜,剥离脑膜,用显微剪轻轻剪下大脑皮层组织,放入盛有解剖液的培养皿内,转移至超净工作台内。用显微剪将取下来的大脑皮层组织在解剖液内剪成约 1 mm³ 大小,用巴氏吸管将组织块连同解剖液转移至 15 mL 离心管内,1000 rpm 离心 3 min,弃上清,0.25% 胰酶消化 10 min,巴氏吸管轻轻吹打成单细胞悬液,计数后种植于细胞培养板中。每两天换液一次。

1.2.2 培养神经元的鉴定 分离培养原代神经元接种至放有包被细胞爬片的 24 孔板中培养,5 天后取出细胞,2% 多聚甲醛固定细胞 30 min,0.01 M PBS 漂洗 3 次。加入 5% 羊血清室温封闭 60 min,加入按 1:200 稀释的 NeuN 一抗,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。第二天取出细胞复温至室温,加 0.01 M PBST 漂洗 4 次,加荧光二抗于样本上进行标记,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h 后以 0.01 M PBST 漂洗 3 次。最后滴加 50 μ L 的抗淬灭封片剂 (含 DAPI) 封片,荧光显微镜下观察,拍照。

1.2.3 糖氧剥夺细胞模型的构建 分离培养大鼠皮质神经元并将培养的大鼠神经元随机分为 4 组,分别是:① 大脑皮层神经元正常培养。② 大脑皮层神经元+糖氧剥夺 2 h+复糖氧 12 h。③ 大脑皮层神经元+500 μ M 依达拉奉。④ 大脑皮层神经元+500 μ M 依达拉奉+糖氧剥夺 2 h+复糖氧 12 h。其中缺氧条件为 3% O₂、5% CO₂,复氧条件为 20.9% O₂、5% CO₂。

1.2.4 CCK-8 检测 原代分离神经元,接种至 96 孔板内,每孔接种 5000 个细胞,每组 3 孔重复,接种 5 d 后构建糖氧剥夺细胞模型,另取 3 孔未接种细胞的空白孔加入 100 μ L 无糖基础培养基作为空白组。作用完后每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,培养箱内孵育 2 h 后酶标仪 450 nm 波长下检测吸光度。细胞活力% = (实验孔 OD - 空白孔 OD) / (正常细胞孔 OD - 空白孔 OD) \times 100%。

1.2.5 流式细胞术检测 细胞凋亡检测原代分离神经元细胞接种至 6 孔板内,每孔接种 10^5 个细胞,每组 3 孔重复,接种 5 d 后构建糖氧剥夺细胞模型。作用完后 0.25% 胰酶消化收集细胞, PBS 洗 3 次, $100\ \mu\text{L}$ 流式凋亡结合缓冲液重悬细胞,加入 $5\ \mu\text{L}$ AnnexinV-FITC 染色液和 $5\ \mu\text{L}$ PI 染色液后混匀,室温避光孵育 15 min 后用 PBS 将液面补至 1 mL。用流式细胞仪分析计算神经元细胞凋亡率。

1.2.6 酶联免疫吸附测定(ELISA) 检测神经元 ROS 取 $50\ \mu\text{L}$ 神经元培养上清加入 96 空板中;除空白孔外,每孔加酶标试剂 $100\ \mu\text{L}$,轻轻晃动混匀,覆上板贴, 37°C 孵育 1 h。弃去孔内液体,甩干,每孔加 $350\ \mu\text{L}$ 洗涤液,静置 30 s 后弃去,如此重复 5 次,拍干。每孔先加入显色剂 A $50\ \mu\text{L}$,再加入显色剂 B $50\ \mu\text{L}$,轻轻震荡混匀, 37°C 避光显色 15 min。依次每孔加终止液 $50\ \mu\text{L}$,终止反应。以空白孔调零,在反应终止 15 分钟内用酶标仪在 450 nm 波长依序测量各孔的光密度(OD 值)。使用 ELISA calc 软件根据神经元细胞浓度和 OD 值做出标准曲线并计算回归方程,根据所得回归方程即可算出样本中 ROS 的含量。

1.2.7 Western blot 实验检测 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路相关蛋白的表达水平将培养并进行相应干预的细胞置于裂解液中裂解 30 min,冰上匀浆后

$12000\times\text{g}$ 离心 10 min,获取上清液,利用 BCA 蛋白质定量试剂盒检测蛋白的浓度。取 $50\ \mu\text{g}$ 蛋白,煮沸变性后上样,依次进行 SDS-PAGE 分离、转膜、封闭,分别加入稀释的 NLRP3(Bioss, 1:1000)、ASC(Bioss, 1:1000)、TXNIP(Abcam, 1:1000)、caspase-1(Bioss, 1:1000)、IL-18(Bioss, 1:1000)、IL-1 β (Bioss, 1:1000)一抗抗体, 4°C 孵育过夜;以 TBST 清洗 5 min,清洗 3 次;加入 HRP 标记羊抗兔 IgG (H+L) 二抗室温孵育 60 min;以 TBST 清洗 5 min,清洗 3 次;避光 ECL 显色,凝胶成像系统进行拍照。采用 ImageJ 5.0 软件分析图像灰度值。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,计量数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有的统计图均使用 GraphPad Prism 5.0 完成。

2 结果

2.1 成功培养 SD 大鼠离体皮质神经元 神经元培养后 24 h 开始长出小的突起,培养 5 天,突起较为明显,具有明显的神经元形态(见图 1A)。经免疫荧光染色后发现,培养的神经元表达神经元特异性标志物 NeuN(见图 1B),表明我们成功培养了 SD 大鼠离体皮质神经元。见图 1。

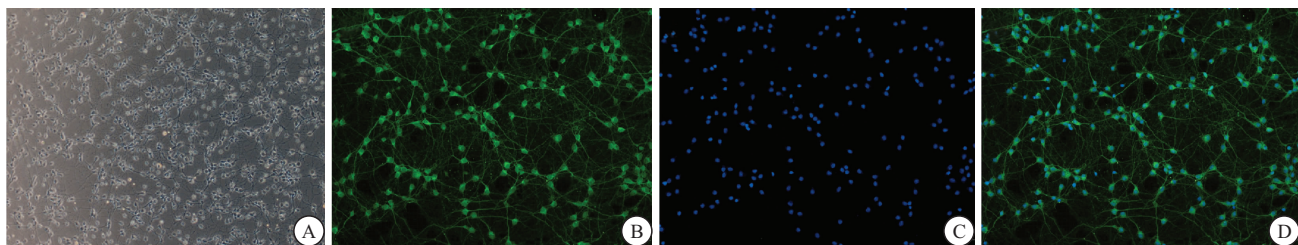


图 1 培养的 SD 大鼠皮质神经元

Figure 1 Cortical neurons of SD rat

注:A. 培养 5 天 SD 大鼠皮质神经元形态;B. 培养 SD 大鼠皮质神经元表达神经元特异性标志物 NeuN;C. DAPI 染培养神经元细胞核;D. B-C 图片叠加

2.2 依达拉奉对皮质神经元细胞活性的影响 按实验分组处理皮质神经元细胞,并通过 CCK-8 检测不同时间点细胞活性变化结果,与正常神经元组相比,糖氧剥夺后神经元细胞增殖活力显著降低($P < 0.001$),依达拉奉处理后明显提高糖氧剥夺组神经元活力,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 2。

2.3 各组细胞凋亡率 正常神经元组、糖氧剥夺组、依达拉奉处理组、糖氧剥夺+依达拉奉处理组细胞凋亡率分别为 $(0.877 \pm 0.112)\%$ 、 $(32.103 \pm 6.221)\%$ 、 $(1.537 \pm 0.631)\%$ 和 $(15.673 \pm 3.242)\%$ 。结果显示在缺糖缺氧状态下神经元细胞凋亡率明显升高($P < 0.001$),与糖氧剥夺组相比,经依达拉奉处理后,神经

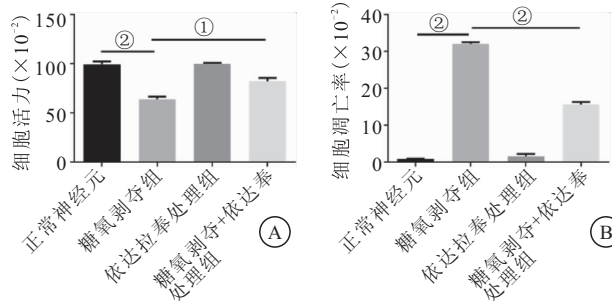


图 2 依达拉奉对皮质神经元活力及凋亡率的影响

Figure 2 Cultured cortical neurons of SD rats

注:A. 糖氧剥夺前后依达拉奉处理对皮质神经元活力的影响;B. 糖氧剥夺前后依达拉奉处理对皮质神经元凋亡率的影响。① $P < 0.01$, ② $P < 0.001$

元的凋亡率明显降低 ($P < 0.001$), 凋亡得到明显改善。

2.4 依达拉奉对皮质神经元细胞 ROS 水平的影响

按实验分组以 ELISA 试剂盒检测神经元培养上清 ROS 含量, 结果表明糖氧剥夺后神经元 ROS 水平显著上升, 依达拉奉处理后神经元产生 ROS 含量又显著下降 (见图 3B)。表明依达拉奉能够降低糖氧剥夺情况下皮质神经元 ROS 的产生。

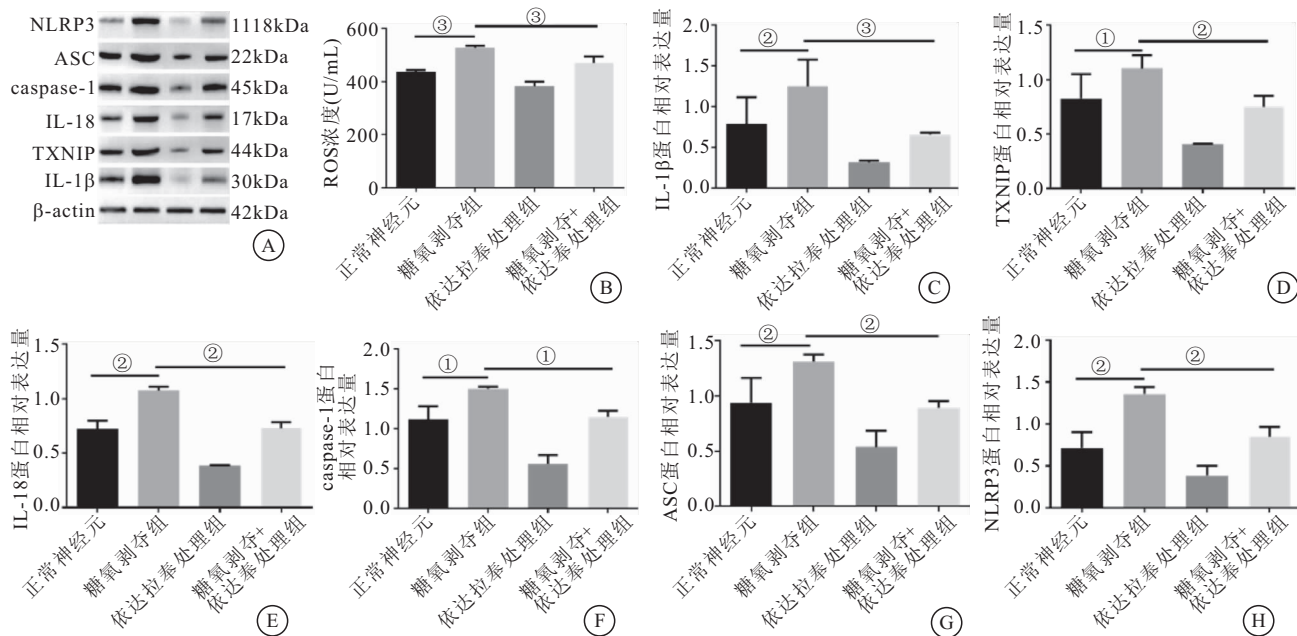


图 3 依达拉奉对皮质神经元的影响

Figure 3 Effects of edaravone on cortical neurons

注: A. 依达拉奉处理前后不同处理组皮质神经元免疫印迹实验; B. 糖氧剥夺前后依达拉奉处理对皮质神经元 ROS 水平的影响; C. 糖氧剥夺前后依达拉奉处理对皮质神经元 IL-1β 蛋白表达的影响; D. 糖氧剥夺前后依达拉奉处理对皮质神经元 TXNIP 蛋白表达的影响; E. 糖氧剥夺前后依达拉奉处理对皮质神经元 IL-18 蛋白表达的影响; F. 糖氧剥夺前后依达拉奉处理对皮质神经元 caspase-1 蛋白表达的影响; G. 糖氧剥夺前后依达拉奉处理对皮质神经元 ASC 蛋白表达的影响; H. 糖氧剥夺前后依达拉奉处理对皮质神经元 NLRP3 蛋白表达的影响。① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$, ③ $P < 0.001$

3 讨论

多数临床研究证实, 氧化应激及炎症反应是介导缺血性脑损伤的两大病理生理机制, 抑制缺血后的氧化应激及炎症反应可能是治疗缺血性脑损伤的重要靶点^[10]。已有研究表明, 依达拉奉可以显著减少梗死体积并缓解神经功能缺损, 并通过减少氧化应激和炎症发挥神经元保护作用^[11-14]。本研究结果显示, 糖氧剥夺后神经元活力显著降低, 凋亡率显著上升, 经依达拉奉处理后, 神经元的凋亡情况得到明显改善。说明依达拉奉对神经元糖氧剥夺损伤的具有神经保护作用, 与以往的研究结论一致。另外, 目前研究认为依达拉奉通过减少 ROS、脂质过氧化和 VEGF 水平诱导内皮细胞增殖^[15], 并且通过抑制氧化应激反应来发挥作用^[16]。在本研究中, 缺氧损伤后, 神经元氧化应激水平显著上升, 依达拉奉处理后神经元氧化应激水

平又显著降低, 也说明了依达拉奉对神经元氧化应激反应的抑制, 与上述研究结果一致。

2.5 依达拉奉对 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路的影响

培养神经元以 Western blot 检测细胞内 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路相关蛋白表达。结果显示, 神经元缺氧后 IL-1β 蛋白 (图 3C)、TXNIP 蛋白 (图 3D)、IL-18 蛋白 (图 3E)、Caspase-1 蛋白 (图 3F)、ASC 蛋白 (图 3G) 和 NLRP3 蛋白 (图 3H) 表达水平均显著上升, 但在进行依达拉奉处理后又显著下降 ($P < 0.01$)。

平又显著降低, 也说明了依达拉奉对神经元氧化应激反应的抑制, 与上述研究结果一致。

ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路作为氧化应激和炎症反应的重要信号通路之一, 参与了多种疾病的发生发展^[17-18], 但 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路在脑缺血/再灌注性脑损伤中的研究较少。脑缺血时氧化呼吸链受损产生的活性氧自由基 (ROS) 可以通过硫氧还蛋白互动性蛋白 (TXNIP) 相互之间解离并结合于 Nod 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3), 进而激活 NLRP3^[19]。NLRP3 炎症小体由 NLRP3/ASC/Caspase-1/IL-1β、IL-18 构成, NLRP3/ASC/Caspase-1 级联通路激活后, 促进 IL-1β、IL-18 的合成和释放并造成脑组织发生炎症损伤^[20-21], 介导脑缺血神经元和神经胶质细胞的凋亡和“焦亡”。本研究中采用依达拉奉后处理大鼠糖氧剥夺损伤神经元, 我们检

测了各组神经元细胞中 NLRP3、ACS、TXNIP、Caspase-1、IL-8 和 IL-1 β 蛋白的表达变化情况。结果显示 ROS 含量及 TXNIP、NLRP3、ASC 和 caspase-1 蛋白水平显著降低,且血清炎症因子及脑组织氧化应激指标也显著变化,因此我们认为依达拉奉能够降低大鼠糖氧剥夺神经元中 ROS 的含量,抑制 TXNIP/NLRP3 等炎性小体相关蛋白的聚集及激活,抑制下游氧化应激指标及炎症因子的释放,从而抑制组织细胞的凋亡,减轻脑组织损伤,提高脑缺血耐受,从而降低神经元损伤。

4 小结

依达拉奉后处理能够抑制 ROS/TXNIP/NLRP3 信号通路,有效减轻大鼠糖氧剥夺神经元损伤,这可能是依达拉奉发挥脑神经保护作用的机制之一。也为临床治疗缺血性脑梗死提供了一定的参考。

【参考文献】

[1] WANG W, JIANG B, SUN H, *et al.* Prevalence, Incidence, and Mortality of Stroke in China Results from a Nationwide Population-Based Survey of 480687 Adults[J]. *Circulation*, 2017, 135(8):759-771.

[2] WAGNER C, MARCHINA S, DEVEAU J A, *et al.* Risk of Stroke-Associated Pneumonia and Oral Hygiene[J]. *Cerebrovasc Dis*, 2016, 41(1-2):35-39.

[3] SHARMA P, SINHA M, SHUKLA R, *et al.* A randomized controlled clinical trial to compare the safety and efficacy of edaravone in acute ischemic stroke [J]. *Ann Indian AcadNeurol*, 2011, 14(2):103-106.

[4] SHAN H, JIAO M, CHENG X, *et al.* Safety and efficacy of edaravone for patients with acute stroke: A protocol for randomized clinical trial[J]. *Medicine*, 2021, 100(8): e24811.

[5] MIYAMOTOK, OHTAKI H, DOHI K, *et al.* Therapeutic time window for edaravone treatment of traumatic brain injury in mice [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013:379206.

[6] FANN D Y, LEE S Y, MANZANERO S, *et al.* Pathogenesis of acute stroke and the role of inflammasomes [J]. *Ageing Res Rev*, 2013, 12(4):941-966.

[7] WANG X, WANG X X, LI R, *et al.* Inhibition of NLRP3 inflammasomes reduced blood brain barrier damage by DHA during early acute cerebral ischemia [J]. *Chinese Journal of Anatomy*, 2021, 44(S01): p. 1.

[8] WANG X X, LI R, WANG X, *et al.* Umbelliferone ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury via upregulating the PPAR gamma expression and suppressing TXNIP/NLRP3 inflammasome [J]. *NeurosciLett*, 2015, 600:182-187.

[9] SUN J, CHI L M, HE Z D, *et al.* NLRP3 inflammasome contributes to neurovascular unit damage in stroke [J]. *J Drug Target*, 2019, 27(8):866-875.

[10] 刁长会,刘修恒.缺血/再灌注损伤的病理生理机制 [J]. *医学综述*, 2018, 24(12): 2306-2311,2317.

[11] WU HY, TANG Y, GAO LY, *et al.* The synergetic effect of edaravone and borneol in the rat model of ischemic stroke [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 740: 522-531.

[12] NI H Y, SONG Y X, WU H Y, *et al.* 2-Methyl-5H-benzo[d]pyrazolo[5,1-b][1,3]oxazin-5-imine, an edaravone analog, exerts neuroprotective effects against acute ischemic injury via inhibiting oxidative stress [J]. *J Biomed Res*, 2018, 32(4): 270-280.

[13] CARBONE F, TEIXEIRA P C, BRAUNERSREUTHER V, *et al.* Pathophysiology and Treatments of Oxidative Injury in Ischemic Stroke: Focus on the Phagocytic NADPH Oxidase 2 [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 23(5): 460-489.

[14] GONZÁLEZ-NIETO D, FERNÁNDEZ-SERRA R, PÉREZ-RIGUEIRO J, *et al.* Biomaterials to Neuroprotect the Stroke Brain: A Large Opportunity for Narrow Time Windows [J]. *Cells*, 2020, 9(5):1074.

[15] MASUDA T, SHIMAZAWA M, HARA H. Retinal Diseases Associated with Oxidative Stress and the Effects of a Free Radical Scavenger (Edaravone) [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017: 9208489.

[16] SHAVIT-STEIN E, ABU RAHAL I, BUSHI D, *et al.* Brain Protease Activated Receptor 1 Pathway: A Therapeutic Target in the Superoxide Dismutase 1 (SOD1) Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(10):3419.

[17] YE X, ZUO D, YU L, *et al.* ROS/TXNIP pathway contributes to thrombin induced NLRP3 inflammasome activation and cell apoptosis in microglia [J]. *BiochemBiophys Res Commun*, 2017, 485(2): 499-505.

[18] LIAN D, DAI L, XIE Z, *et al.* Periodontal ligament fibroblasts migration injury via ROS/TXNIP/Nlrp3 inflammasome pathway with porphyromonasgingivalis lipopolysaccharide [J]. *MolImmunol*, 2018, 103: 209-219.

[19] FANN D Y, LEE SY, MANZANERO S, *et al.* Pathogenesis of acute stroke and the role of inflammasomes [J]. *Ageing Res Rev*, 2013, 12: 941-66.

[20] WANG X, LI R, WANG X, *et al.* Umbelliferone ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury via upregulating the PPAR gamma expression and suppressing TXNIP/NLRP3 inflammasome [J]. *NeurosciLett*, 2015, 23: 182-187.

[21] TONG Y, DING Z H, ZHAN F X, *et al.* The NLRP3 inflammasome and stroke [J]. *Int J ClinExp Med*, 2015, 8: 4787-4794.

(收稿日期: 2022-01-11; 修回日期: 2022-02-13; 编辑: 张翰林)