·论著·

Klotho 蛋白调节 Caspase-8/Caspase-3 表达保护缺氧缺血性脑损伤大鼠神经细胞凋亡的效果*

张晶[1]　张露[2]　毕芳芳[2]　刘圆圆[1]　王颖娴[1]　杨玉琮[1]

（1.西安交通大学第一附属医院检验科，陕西 西安 710061；2.西安培华学院医学院，陕西 西安 710125）

【摘要】 目的 探究 Klotho 蛋白调节半胱氨酸蛋白酶-8(Caspase-8)/Caspase-3 表达对缺氧缺血性脑损伤(HIBD)大鼠神经细胞凋亡的保护作用。**方法** SPF 级 C57BL/6 新生大鼠 75 只，60 只用于构建 HIBD 大鼠模型，并将其分为模型组和 Klotho 低、中、高剂量组，另取 15 只新生大鼠作为假手术组。Klotho 低、中、高剂量组分别用 10、20、30 mg/kg 的 Klotho 蛋白持续脑室注射处理 5 d，假手术组和模型组用同等体积生理盐水处理。对比各组脑室注射处理后神经功能、神经细胞凋亡率、脑组织中 Caspase-8、Caspase-3 和氧化应激指标。**结果** 与假手术组相比，模型组大鼠 Longa 法评分和神经细胞凋亡率明显增加，大脑皮层组织中 Caspase-8、Caspase-3、活性氧(ROS)和丙二醛(MDA)水平明显升高，超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性明显下降(均 $P<0.05$)。与模型组相比，Klotho 低、中、高剂量组 Longa 法评分、神经细胞凋亡率和大脑皮层组织中 Caspase-8、Caspase-3、ROS、MDA 水平均明显下降，SOD 和 GSH-Px 活性均明显升高(均 $P<0.05$)。与 Klotho 低剂量组相比，Klotho 中、高剂量组的 Longa 法评分、神经细胞凋亡率和大脑皮层组织中 Caspase-8、Caspase-3、ROS、MDA 水平均明显下降，SOD 和 GSH-Px 活性均明显升高(均 $P<0.05$)。与 Klotho 中剂量组相比，Klotho 高剂量组的 Longa 法评分、神经细胞凋亡率和大脑皮层组织中 Caspase-8、Caspase-3、ROS、MDA 水平均明显下降，SOD 和 GSH-Px 活性均明显升高(均 $P<0.05$)。**结论** 30 mg/kg 的 Klotho 蛋白能有效抑制 HIBD 大鼠神经细胞凋亡，改善大鼠神经功能，其机制可能与抑制大鼠脑组织 Caspase-8/Caspase-3 表达，降低脑组织氧化应激损伤有关。

【关键词】 缺氧缺血性脑损伤；神经细胞；凋亡；Caspase 蛋白；Klotho 蛋白

【中图分类号】 R741.02　**【文献标志码】** A　**DOI**：10.3969/j.issn.1672-3511.2026.04.003

Analysis of the effect of Klotho protein regulating Caspase-8/Caspase-3 expression in protecting neuronal cell apoptosis in rats with hypoxic-ischemic brain injury

ZHANG Jing[1], ZHANG Lu[2], BI Fangfang[2], LIU Yuanyuan[1], WANG Yingxian[1], YANG Yucong[1]

(1. *Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an* 710061, *China*; 2. *School of Medicine, Xi'an Peihua College, Xi'an* 710125, *China*)

【Abstract】 Objective To explore the protective effect of Klotho protein regulating the expression of cysteine protease-8 (Caspase-8)/Caspase-3 on neuronal apoptosis in rats with hypoxic-ischemic brain injury (HIBD). **Methods** A total of 60 HIBD rat models were constructed and divided into the model group and the low-dose, medium-dose, and high-dose Klotho groups, and another 15 neonatal rats were selected as the sham operation group. The low-dose, medium-dose and high-dose Klotho groups were treated with continuous ventricular injection of 10, 20 and 30mg/kg of Klotho protein for 5 days respectively, while the sham operation group and the model group were treated with the same volume of normal saline. The neurological function, apoptosis rate of nerve cells, Caspase-8, Caspase-3 and oxidative stress indicators in brain tissue of each group were compared after ventricular injection treatment. **Results** Compared with the sham opera-

基金项目：陕西省自然科学基础研究计划项目(2025JC-YBMS-962)

通信作者：杨玉琮，教授，E-mail：276366899@qq.com

引用本文：张晶，张露，毕芳芳，等. Klotho 蛋白调节 Caspase-8/Caspase-3 表达保护缺氧缺血性脑损伤大鼠神经细胞凋亡的效果[J]. 西部医学，2026，38(4)：484-489. DOI：10.3969/j.issn.1672-3511.2026.04.003

tion group, the Longa method score and the apoptosis rate of nerve cells in the model group were significantly increased, and the levels of Caspase-8, Caspase-3, reactive oxygen species (ROS), and malondialdehyde (MDA) in the brain tissue were significantly elevated, and the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) decreased significantly (all $P < 0.05$). Compared with the model group, the Longa score, the apoptosis rate of nerve cells, and the levels of Caspase-8, Caspase-3, ROS and MDA in brain tissue all decreased significantly the Klotho protein groups, and the activities of SOD and GSH-Px increased (all $P < 0.05$). Compared with the low-dose group of Klotho protein, the Longa method score, the apoptosis rate of nerve cells, and the levels of Caspase-8, Caspase-3, ROS, and MDA in brain tissue all decreased significantly in the medium and high-dose groups, and the activities of SOD and GSH-Px increased significantly (all $P<0.05$). Compared with the medium-dose group of Klotho protein, the Longa method score, the apoptosis rate of nerve cells, and the levels of Caspase-8, Caspase-3, ROS, and MDA in brain tissue all decreased significantly in the high-dose group, and the activities of SOD and GSH-Px increased significantly (all $P<0.05$).

Conclusion The Klotho protein at a concentration of 30mg/kg can effectively inhibit the apoptosis of nerve cells in HIBD rats and improve the extension function of rats. The mechanism may be related to the inhibition of Caspase-8/Caspase-3 expression in rat brain tissue and the reduction of oxidative stress injury in brain tissue.

【Key words】 Hypoxic-ischemic brain injury; Nerve cells; Apoptosis; Caspase protein; Klotho protein

缺氧缺血性脑损伤(Hypoxic ischemic brain damage,HIBD)是新生儿科常见疾病,指由围产期窒息所致脑部血氧供应不足所引发脑组织和脑功能受损,可导致新生儿脑瘫、癫痫、视觉听觉运动和认知功能障碍等神经后遗症,严重者甚至导致新生儿死亡,影响新生儿存活质量和生命安全。相关报道指出,每1 000例活产新生儿中会出现 1.5 例 HIBD[1],25%缺氧缺血性脑病患儿会出现永久性神经系统后遗症[2-3]。HIBD 是多因素共同参与的复杂性病理生理过程,其中氧化应激在脑损伤过程中起到重要作用[4]。Klotho 蛋白是一种由 *Klotho* 基因编码的与抗衰老相关的蛋白,能通过调控信号通路、离子通道或其他基因表达等多种途径,发挥抗衰和保护血管等作用[5]。最新研究发现,Klotho 蛋白具有提高细胞解毒有害活性氧(Reactive oxygen species,ROS)的能力,过表达能有效增强缺血再灌注损伤大鼠的抗氧化能力,从而为缺血性脑损伤的治疗提供一种新的研究方向[6]。半胱氨酸蛋白酶(Caspase)是一组存在于细胞质,与细胞凋亡密切相关的蛋白,其中 Caspase-8 属于启动性 Caspase,其前体物质的死亡效应结构域可与 FADD 蛋白的 N 末端死亡效应结构域结合,形成 FasL-Fas-Fadd-pro-caspase-8 信号复合物,后者能催化 pro-caspase-8 完成自我切割,产生活化的 Caspase-8,激活 Caspase-3,最终引发细胞凋亡[7]。已有研究发现,抑制 Klotho 表达能促进效应性 Caspase-3 活化,抗肾脏细胞凋亡作用,从而降低损伤[8-9],提示临床可将调控 Klotho/Caspase 相关蛋白表达作为预防和治疗某些疾病的靶向途径。然而,目前关于 Klotho 是否能通过调控 Caspase-8 表达保护 HIBD 大鼠神经元损伤细胞凋亡的相关报道甚少。鉴于此,本研究以新生大鼠 HIBD 模型为对象,探究 Klotho 蛋白对大鼠模型神经细胞凋亡和 Caspase-8/Caspase-3 表达水平的影响,以期为 HIBD 的治疗提供更多依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 C57BL/6 新生大鼠(出生 7 d)75 只,雌雄各半,体质量(15±2)g,由西北农林科技大学实验动物中心提供(许可证号 SK(陕)2024010)。所有大鼠均饲养于温度(23±2)℃、相对湿度 45%~65%的环境中,室内光照维持 12 h/12 h 昼夜变化。实验操作符合动物伦理委员会相关规定(编号:XPHU2025007)。

1.2 主要试剂和仪器 Klotho 蛋白(武汉菲恩生物科技有限公司);TUNEL 试剂盒(德国达姆施塔特默克集团);RIPA 裂解液(翌圣生物科技(上海)有限公司);Caspase-8 抗体(上海碧云天生物技术股份有限公司);Caspase-3(北京百奥莱博科技有限公司);actin(爱必信(上海)生物科技有限公司);HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(上海酶联生物科技有限公司);ECL 试剂盒(Proteintech 中国公司);ROS 试剂盒(翌圣生物科技(上海)有限公司);超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)试剂盒(上海岑特生物科技有限公司);丙二醛(Malondialdehyde,MDA)试剂盒(北京百奥莱博科技有限公司);谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase,GSH-Px)试剂盒(优利科(上海)生命科学有限公司);瑞沃德 DSC-400 单细胞悬液制备仪(深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司);Microfuge 20/20R 台式高速离心机和 Microfuge 16 台式微量离心机(贝克曼库尔特国际贸易(上海)有限公司)。

1.3 动物分组和建模 60 只新生大鼠参照文献构建 HIBD 模型,具体操作:分离大鼠左侧颈总动脉,双重

结扎大鼠左侧颈总动脉，并从血管中间剪断血管，缝合切口皮肤，休息 1 h 后，将大鼠置于氧体积 80 mL/L 的密闭缺氧舱内，缺氧处理 2.5 h。观察处理后的大鼠呼吸、平衡能力、运动能力、夹尾反应等情况，以呼吸加速、平衡失调、只可原地旋转等现象者为建模成功。剩余 15 只作为假手术组，大鼠仅分离出其左侧颈总动脉，不做结扎和缺氧处理[10]。60 只模型大鼠随机分为模型组、低剂量组、中剂量组和高剂量组，腹腔注射 4%水合氯醛，对大鼠进行麻醉处理，然后将大鼠固定于立体定位仪上，向大鼠患侧脑室尾部（距前囟口 0.9 mm、正中线旁开 1.4 mm 处）大脑皮层下 4.1 部位留置微导管，用 5 μL 微量进样器向各组大鼠给药，其中 Klotho 低、中、高剂量组分别给予 10、20、30 mg/kg 的 Klotho 蛋白；假手术组和模型组给予等体积的无菌生理盐水，注射时间 5 min。脑室注射 1 次/d，连续注射 5 d。

1.4　神经功能检测　完成脑室注射后第 3 天采用 Longa 法评估各组大鼠神经功能：大鼠各方面正常为 0 分；左侧前爪无法完全伸展为 1 分；行走时会向左侧旋转为 2 分；站立时会向左侧倾倒为 3 分；无法自发行走为 4 分。

1.5　TUNEL 染色法检测神经元细胞凋亡率　各组大鼠断头处死后，于冰盘上快速剖出其患侧大脑皮层组织，将冠状面切分为两部分，一部分暂存于内含有 HBSS（含 Mg^{2+} 和 Ca^{2+}）的培养皿中，尽可能去除脑组织中的血管，制备成石蜡切片，放入 60 ℃恒温干燥箱烘烤 3 h，按照 TUNEL 试剂盒说明书测定细胞凋亡情况，标记后苏木精复染，相差显微镜 400×倍镜下拍照，计算细胞凋亡率，即 TUNEL 阳性细胞数占总细胞数的百分比。另一份部分用于后续检测。

1.6　Western blot 检测 Caspase-8 和 Caspase-3 蛋白表达水平　冰盘上剪取大鼠患侧大脑皮层组织 10 mg，加入 RIPA 裂解液，冰浴裂解 20～30 min 后，超声破碎仪进一步破碎细胞；10 000× g 高速离心分离 15 min，取组织蛋白上清液保存待用。取 20 μL 上清液 SDS-PAGE 凝胶电泳，蛋白条带转移至 PVADF 膜上，5% 脱脂奶粉封闭孵育 2 h；加入 Caspase-8、Caspase-3（1∶1 000稀释）和 β-actin（1∶1 000稀释）蛋白一抗，4 ℃孵育过夜，吐温 tris 缓冲液洗冲洗 3 次（10 min/次）；室温条件下加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 作为二抗，再次震荡孵育 2 h。ECL 法曝光显影，actin 作为内参对照，Image-Pro Plus 蛋白图像处理系统分析计算目标蛋白相对表达水平。

1.7　氧化应激指标检测　冰盘上快速剖出大鼠患侧大脑皮层组织 10 mg 加入高速匀浆机中，按照质量体积 1∶9的比例添加预冷的生理盐水，10 000×g 匀浆处理 10 min，1 000×g 离心分离 15 min，留取上清液保存待用。严格参照试剂盒说明测定各组大鼠脑组织中 ROS、SOD、MDA、GSH-Px 表达水平。

1.8　统计学分析　采用 SPSS 25.0 统计学软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较用 LSD 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　各组大鼠 Longa 法评分　与假手术组相比，模型组大鼠 Longa 法评分明显增加（均 $P<0.05$）；与模型组相比，Klotho 低、中、高剂量组 Longa 法评分明显下降（均 $P<0.05$）；与 Klotho 低剂量组相比，Klotho 中、高剂量组的 Longa 法评分明显下降（均 $P<0.05$）；与 Klotho 中剂量组相比，Klotho 高剂量组 Longa 法评分明显下降（均 $P<0.05$）。见表 1。

表 1　各组大鼠 Longa 法评分比较（$\bar{x}\pm s$）

Table 1　Comparison of Longa method scores among rats in each group

组别	n	Longa 法评分（分）
假手术组	15	0.00±0.00
模型组	15	2.80±0.56①
Klotho 低剂量组	15	2.40±0.51①②
Klotho 中剂量组	15	1.87±0.52①②③
Klotho 高剂量组	15	1.33±0.49①②③④
F		82.761
P		<0.001

注：与假手术组相比，①$P<0.05$；与模型组相比，②$P<0.05$；与低剂量组相比，③$P<0.05$；与中剂量组相比，④$P<0.05$。

2.2　各组大鼠患侧大脑皮层神经细胞凋亡率变化比较　与假手术组相比，模型组大鼠神经细胞凋亡率明显增加（$P<0.05$）；与模型组相比，Klotho 低、中、高剂量组大鼠神经细胞凋亡率明显下降（均 $P<0.05$）；与 Klotho 低剂量组相比，Klotho 中、高剂量组神经细胞凋亡率明显下降（均 $P<0.05$）；与 Klotho 中剂量组相比，Klotho 高剂量组神经细胞凋亡率明显下降（均 $P<0.05$）。见图 1、2。

2.3　各组大鼠患侧大脑皮层 Caspase-8、Caspase-3 蛋白表达水平比较　与假手术组相比，模型组大鼠脑组织中 Caspase-8、Caspase-3 蛋白表达水平明显增加（均 $P<0.05$）；与模型组相比，Klotho 低、中、高剂量组脑组织中 Caspase-8、Caspase-3 蛋白表达水平均明显下降（均 $P<0.05$）；与 Klotho 低剂量组相比，Klotho 中、高剂量组脑组织中 Caspase-8、Caspase-3 蛋白表达水平均明显下降（均 $P<0.05$）；与 Klotho 中剂量组相比，Klotho 高剂量组脑组织中 Caspase-8、Caspase-3 蛋白表达水平均明显下降（均 $P<0.05$）。见图 3、表 2。

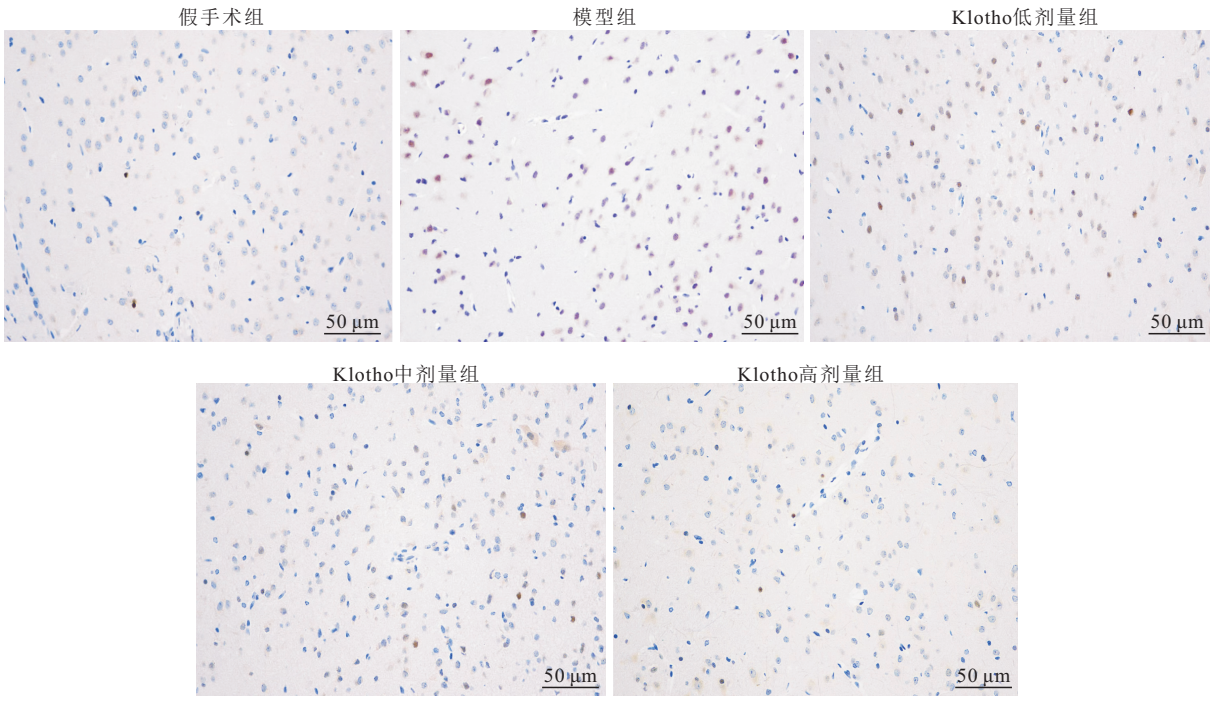

图 1　各组大鼠患侧大脑皮层神经细胞凋亡情况

Figure 1　The apoptosis of nerve cells in the affected cerebral cortex of rats in each group

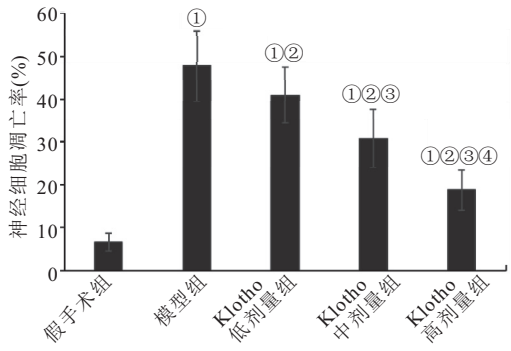

图 2　各组大鼠患侧大脑皮层神经细胞凋亡率变化比较

Figure 2　Comparison of the changes in the apoptosis rate of nerve cells in the affected cerebral cortex of each group of rats

注：与假手术组比，①$P<0.05$；与模型组比，②$P<0.05$；与 Klotho 低剂量组比，③$P<0.05$；与 Klotho 中剂量组比，④$P<0.05$。

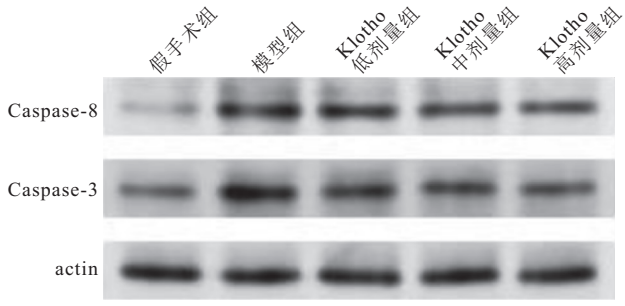

图 3　各组大鼠脑损伤侧大脑海马区脑组织 Caspase-8、Caspase-3 蛋白表达条带图

Figure 3　Expression bands of Caspase-8 and Caspase-3 proteins in the hippocampal region of the injured side of the brain in each group of rats

表 2　各组大鼠患侧大脑皮层 Caspase-8、Caspase-3 蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$）

Table 2　Comparison of the protein expression levels of Caspase-8 and Caspase-3 in the affected cerebral cortex of each group of rats

组别	n	Caspase-8	Caspase-3
假手术组	15	0.08±0.02	0.44±0.08
模型组	15	0.99±0.15①	0.89±0.16①
Klotho 低剂量组	15	0.83±0.13①②	0.72±0.15①②
Klotho 中剂量组	15	0.74±0.12①②③	0.60±0.13①②③
Klotho 高剂量组	15	0.60±0.10①②③④	0.46±0.11①②③④
F		18.472	19.733
P		<0.001	<0.001

注：与假手术组比，①$P<0.05$；与模型组比，②$P<0.05$；与 Klotho 低剂量组比，③$P<0.05$；与 Klotho 中剂量组比，④$P<0.05$。

2.4　各组大鼠患侧大脑皮层脑组织氧化应激水平变化比较　与假手术组相比，模型组大鼠脑组织中 ROS 荧光强度、MDA 水平明显升高，SOD 和 GSH-Px 活性均明显下降（均 $P<0.05$）；与模型组相比，Klotho 低、中、高剂量组脑组织中 ROS 荧光强度、MDA 水平明显下降，SOD 和 GSH-Px 活性均明显升高（均 $P<0.05$）；与 Klotho 低剂量组相比，Klotho 中、高剂量组脑组织中 ROS 荧光强度、MDA 水平明显下降，SOD 和 GSH-Px 活性均明显升高（均 $P<0.05$）；与 Klotho 中剂量组相比，Klotho 高剂量组脑组织中 ROS 荧光强度、MDA 水平明显下降，SOD 和 GSH-Px 活性均明显升高（均 $P<0.05$）。见表 3。

3　讨论

HIBD是新生儿期常见疾病，也是引发新生儿脑

表 3　各组大鼠患侧大脑皮层脑组织氧化应激水平变化比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3　Comparison of changes in oxidative stress levels in the cerebral cortex and brain tissue of the affected side in each group of rats

组别	n	ROS 荧光强度	SOD(U/mg)	MDA(μmol/mg)	GSH-Px(U/mg)
假手术组	15	103.27±14.69	136.01±14.94	1.70±0.31	92.31±6.94
模型组	15	185.20±21.90①	63.21±11.35①	4.85±0.46①	45.92±5.74①
Klotho 低剂量组	15	168.73±21.18①②	73.50±10.17①②	4.42±0.50①②	54.87±5.64①②
Klotho 中剂量组	15	154.80±19.27①②③	87.30±9.15①②③	3.88±0.49①②③	64.02±7.49①②③
Klotho 高剂量组	15	137.27±13.72①②③④	99.74±9.58①②③④	2.90±0.33①②③④	74.86±6.11①②③④
F		43.557	94.796	131.712	118.125
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：与假手术组比，①$P<0.05$；与模型组相比，②$P<0.05$；与 Klotho 低剂量组相比，③$P<0.05$；与 Klotho 中剂量组相比，④$P<0.05$。

瘫、智力低下等神经后遗症和导致新生儿死亡的主要原因之一。针对 HIBD 治疗目前上缺乏良好方案，主要以低温、高压氧等方法控制惊厥、维持良好通气、减轻脑水肿等为主，有关干细胞治疗 HIBD 尚处于临床试验阶段。如何有效减轻 HIBD 患儿病症，减轻神经功能后遗症，仍是当前研究者面临的重大难题。

神经细胞坏死性凋亡是 HIBD 发生的重要缓解。研究已证明，新生大鼠 HIBD 后 4 周内患侧大脑皮层、海马区、丘脑部位和纹状体均持续存在神经细胞凋亡[11]，抑制神经细胞凋亡能有效改善 HIBD 神经功能障碍[12]。提示，抑制神经细胞凋亡是 HIBD 治疗的重点。Klotho 主要表达于脑组织和肾脏组织的蛋白，具有抗炎、抗氧化、抗细胞凋亡等生物活性，可通过 ROS/Src 同源性和磷酸化结构域蛋白(Src Homology and Phosphorylation Domain-containing protein 1，SHP1)途径，抑制巨噬细胞 G 蛋白偶联受体激酶 2(G protein-coupled receptor kinase 2，GRK2)/磷脂酶 Cβ(Phosphatidylinositol Cβ，PLC-β)介导的内质网应激等多种途径，发挥抗细胞凋亡作用[8-9]。徐文武[13]在急性脑梗死疾病研究中发现，患者血清 Klotho 与脑梗死面积和神经功能损伤评分呈负相关。Zhu 等[14]研究发现，向大鼠脑室注入携带 Klotho cDNA 的慢病毒，能诱导大脑中动脉闭塞大鼠脑组织内 Klotho 蛋白上调表达，改善大鼠神经行为缺陷，减小大鼠脑梗死体积。本研究观察发现，不同浓度 Klotho 处理的 3 组大鼠 Longa 法评分和神经细胞凋亡率均明显下降，且各指标变化随 Klotho 蛋白浓度增大而明显变化($P<0.01$)，该结果与张晶等[15]在急性脑梗死大鼠和 Zhu 等[14]在大脑中动脉闭塞大鼠中观察结果相似。证实，Klotho 蛋白对 HIBD 神经功能具有保护作用，然而，关于其具体作用机制目前尚不明确。

Caspase 是调控细胞凋亡的重要蛋白，其中临床研究较多的 Caspase-8 和 Caspase-3 分别属于启动性 Caspase 和效应性 Caspase。有研究发现，Caspase-8 在氧化应激诱导的细胞凋亡中扮演重要角色，疾病状态下，ROS 生成可导致 Caspase-8 去谷胱甘肽化和活化[16]；抗氧化剂的使用可减少 ROS 产生，降低活化的 Caspase-8 和 Caspase-3 的表达，提高细胞存活率[17]。有研究显示，急性脑梗死患者 Caspase-3 与脑梗死面积和神经功能损伤评分呈正相关($P<0.01$)[13]；而向脑缺血再灌注大鼠脑室注射 Caspase 抑制剂，能有效缓解大鼠神经元凋亡，减少脑梗死面积[18]。此外，Olejnik 等[19]研究亦发现，用重组 Klotho 蛋白灌注离体心肌缺血再灌注损伤大鼠心脏，能有效抑制心脏组织 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 水平表达，减少心脏缺血再灌注损伤期间细胞凋亡。本研究观察显示，与模型组比，不同浓度 Klotho 处理的 3 组大鼠脑组织中 Caspase-8 和 Caspase-3 均明显下降，且大鼠脑组织中 Caspase-8 和 Caspase-3 水平随 Klotho 蛋白浓度增大而明显下降($P<0.01$)，该结果与 Olejnik 等[19]等观察结果一致。提示，Klotho 蛋白可抑制 HIBD 大鼠脑损伤部位细胞凋亡蛋白 Caspase-8 和 Caspase-3 表达，且存在剂量依赖性。

氧化应激损伤是 HIBD 神经损伤的病理基础[20]。脑缺氧、缺血和缺血再灌注均会引发严重的氧化应激，表现为 ROS 生成过多，抗氧化活性能力下降。健康条件下，ROS 的产生和清除处于动态平衡状态，缺血缺氧情况下会由大量 ROS 产生，造成细胞损伤，上皮细胞，通透性增加，引起脂质过氧化反应，增加 MDA 形成，促使细胞内抗氧化物质 SOD 和 GSH-Px 等活性酶释放至细胞外[21]。段东印[22]研究发现，HIBD 发生后大鼠脑组织中 MDA 水平显著升高，发病后 24 h 达到峰值；SOD 和 GSH-Px 活性持续下降，发病后 24 h 降至最低点。Olejnik 等[23]研究显示，Klotho 蛋白具有抑制缺血再灌注损伤大鼠机体氧化应激水平的作用。Xu 等[24]研究显示，补充 Klotho 能有效改善心肌梗死大鼠 SOD、MDA 和 GSH 浓度，改善大鼠心肌梗死后的氧化应激损伤。Wu 等[25]研究显示，敲除 *Klotho* 基因会导致 MDA 和 8-羟基脱氧鸟苷水平升高，导致机体氧化应激水平升高。本研究结

果显示，与模型组相比，不同浓度 Klotho 处理的 3 组大鼠脑组织中 ROS 和 MDA 水平均明显下降，SOD 和 GSH-Px 活性均明显增强，且大鼠脑组织中 ROS、SOD、MDA、GSH-Px 活性随 Klotho 蛋白浓度增大而明显改变（$P<0.01$），该结果与张晶等[15]和 Xu 等[24]研究结果相似。提示，Klotho 蛋白可抑制 HIBD 大鼠脑损伤部位 ROS 过度形成，阻断局部脂质过氧化反应，增强局部抗氧化活性，且存在剂量依赖性。

4 结论

Klotho 蛋白能有效抑制 HIBD 大鼠神经细胞凋亡，改善大鼠神经功能，且存在剂量依赖性，其机制可能与抑制大鼠脑组织 Caspase-8/Caspase-3 表达，降低脑组织氧化应激损伤有关。然而，目前尚未找到合适的阳性对照药物，因此本研究未设定阳性对照组，可能一定程度上影响对 Klotho 蛋白用于 HIBD 神经功能保护效果的观察，有待后续实验中进一步完善研究。

【参考文献】

[1] GLASS H C, WOOD T R, COMSTOCK B A, *et al*. Predictors of death or severe impairment in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. JAMA Netw Open, 2024, 7(12): e2449188.

[2] WU Y W, MONSELL S E, GLASS H C, *et al*. How well does neonatal neuroimaging correlate with neurodevelopmental outcomes in infants with hypoxic-ischemic encephalopathy? [J]. Pediatr Res, 2023, 94(3): 1018-1025.

[3] 谢涛波，钟纯正，符尧天，等. 缺氧缺血性脑损伤对新生小鼠脑组织 AQP-9 表达和空间学习记忆能力的影响[J]. 中南医学科学杂志，2024，52(5)：711-714，747.

[4] JIN N, SHA S, RUAN Y H, *et al*. Identification and analysis of oxidative stress-related genes in hypoxic-ischemic brain damage using bioinformatics and experimental verification[J]. Immun Inflamm Dis, 2024, 12(8): e70000.

[5] MARTÍN-NÚÑEZ E, PÉREZ-CASTRO A, TAGUA V G, *et al*. Klotho expression in peripheral blood circulating cells is associated with vascular and systemic inflammation in atherosclerotic vascular disease[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 8422.

[6] LI Z, LI J, LI L, *et al*. Klotho enhances stability of chronic kidney disease atherosclerotic plaques by inhibiting GRK2/PLC-β-mediated endoplasmic reticulum stress in macrophages *via* modulation of the ROS/SHP1 pathway[J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 32091.

[7] WU J Y, LIN S M, CHEN W X, *et al*. TNF-α contributes to sarcopenia through caspase-8/caspase-3/GSDME-mediated pyroptosis[J]. Cell Death Discov, 2023, 9(1): 76-90.

[8] LI X B, LIU J L, ZHAO S, *et al*. Recombinant Klotho protein protects pulmonary alveolar epithelial cells against sepsis-induced apoptosis by inhibiting the Bcl-2/Bax/caspase-3 pathway [J]. Adv Clin Exp Med, 2025, 34(1): 123-134.

[9] XIONG G X, WANG S L, PAN Z J, *et al*. Long non-coding RNA MEG3 regulates the progress of osteoarthritis by regulating the miR-34a/Klotho axis[J]. Ann Transl Med, 2022, 10(8): 454.

[10] 苟知贤，胡兴，王幽梦，等. 褪黑素对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠海马区细胞焦亡的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志，2020，35(18)：1416-1420.

[11] 王菊莉，韩玉昆. 新生大鼠缺氧缺血性脑损伤神经细胞凋亡时程[J]. 新生儿科杂志，2003，18(3)：111-113，145.

[12] LI L Y, LIN Z, YUAN J H, *et al*. The neuroprotective mechanisms of naringenin: inhibition of apoptosis through the PI3K/AKT pathway after hypoxic-ischemic brain damage[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 318(Pt A): 116941.

[13] 徐文武，汪昆. Klotho、Caspase-3、Bcl-2 表达水平评估急性脑梗死疾病发展程度的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志，2021，42(16)：2030-2032，2048.

[14] ZHU G H, XIANG T, LIANG S J, *et al*. Klotho gene might antagonize ischemic injury in stroke rats by reducing the expression of AQP4 *via* P38MAPK pathway[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2023, 32(8): 107205.

[15] 张晶，张祎，马晨，等. Klotho 蛋白灌胃对急性脑梗死大鼠脑缺血再灌注损伤的改善作用及其机制[J]. 山东医药，2024，64(21)：24-29.

[16] DUBEY M, NAGARKOTI S, AWASTHI D, *et al*. Nitric oxide-mediated apoptosis of neutrophils through caspase-8 and caspase-3-dependent mechanism[J]. Cell Death Dis, 2016, 7(9): e2348.

[17] HSU C S, CHANG S H, YANG R C, *et al*. Lipopolysaccharide-induced lysosomal cell death through reactive oxygen species in rat liver cell clone 9[J]. Environ Toxicol, 2024, 39(11): 5008-5018.

[18] 唐诗琪. 大鼠脑缺血再灌注后 Cathepsin B 介导的细胞凋亡与 Caspase-9-Caspase-3 凋亡信号通路的关系[D]. 衡阳：南华大学，2017.

[19] OLEJNIK A, RAK-PASIKOWSKA A, KRZYWONOS-ZAWADZKA A, *et al*. Modulation of cell death pathways by recombinant Klotho protein in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Eur J Prev Cardiol, 2025, 32(Supplement_1): zwaf236.530.

[20] HU Y Y, NAN Y, LIN H Z, *et al*. Celastrol ameliorates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats by reducing oxidative stress and inflammation [J]. Pediatr Res, 2024, 96(7): 1681-1692.

[21] 刘庆，卢蓉，郝莉霞. Nrf2 基因对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑组织氧化应激和 JAK2/STAT3 信号通路的影响[J]. 局解手术学杂志，2020，29(8)：604-609.

[22] 段东印. 炎症因子和自由基在诱导缺氧缺血性脑损伤新生大鼠神经细胞凋亡中的作用[J]. 中华实用儿科临床杂志，2013，28(23)：1825-1827.

[23] OLEJNIK A, KRZYWONOS-ZAWADZKA A, BIL-LULA I. Klotho protein inhibits extracellular matrix degradation and apoptosis during heart ischemia/reperfusion injury *via* regulation of the NOS/MMP signalling axis[J]. Eur J Prev Cardiol, 2024, 31(Supplement_1): zwae175.012.

[24] XU Z F, ZHENG S X, FENG X Q, *et al*. Klotho gene improves oxidative stress injury after myocardial infarction[J]. Exp Ther Med, 2021, 21(1): 52.

[25] WU C Y, SONG D F, LU T H, *et al*. Klotho null mutation indirectly leads to age-related lacrimal gland degeneration in mutant mice[J]. Biology, 2023, 12(10): 1328.

（收稿日期：2025-06-25；修回日期：2026-01-21；编辑：黎仕娟）