

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.11.005

dl-3- 正丁基苯酞对脑损伤大鼠的神经保护作用的实验研究 *

段 鹏¹ 郭秦乐² 刘 利¹ 李晓青¹ 白立曦¹ 许 静^{1Δ}

(西安交通大学第一附属医院 1 急诊科; 2 重症医学科 陕西 西安 710061)

摘要 目的:研究 dl-3- 正丁基苯酞(NBP)对脑损伤大鼠的神经保护作用。**方法:**将 100 只 7 周龄清洁级雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠随机分成 5 组,分别为假手术组、模型组、NBP 低、中和高剂量组,每组 20 只。使用控制性皮层撞击损伤建立中型大鼠颅脑损伤模型。将 NBP 溶解在大豆油中,NBP 低、中和高剂量组分别按照每天 20、40 和 80 mg/kg 的剂量灌胃,假手术组和模型组灌胃等体积的大豆油,共给药 2 周。采用改良神经功能缺损评分(mNSS)对大鼠的神经系统状况进行评价。检测各组大鼠治疗后的脑组织含水量以及脑组织中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平。TUNEL 方法鉴定细胞的凋亡。通过 RT-PCR、Western blot 或免疫组化检测脑组织中 Nrf2、NQO-1、HO-1、ApoJ、MMP9、AQP4、Caspase-3 和 AKT 的表达。**结果:**NBP 治疗 2 周后,NBP 低、中和高剂量组大鼠的 mNSS 评分和神经元凋亡率以剂量依赖性方式显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,NBP 低、中和高剂量组大鼠的脑含水量均显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,NBP 低、中和高剂量组大鼠的 MDA 显著降低,而 SOD 和 GSH-Px 显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,NBP 低、中和高剂量组大鼠的细胞核 Nrf2 显著升高,而细胞质 Nrf2 显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,NBP 低、中和高剂量组大鼠的 NQO-1 和 HO-1 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,NBP 低、中和高剂量组大鼠的 AQP4、MMP-9、ApoJ 和 Caspase-3 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低,而 AKT 显著升高($P<0.05$)。**结论:**NBP 对创伤性颅脑外伤大鼠具有一定的神经保护作用。

关键词:dl-3- 正丁基苯酞; 创伤性颅脑外伤; 抗氧化; 神经元凋亡; 脑水肿

中图分类号:R-33;R651 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)11-2024-08

Neuroprotective Effect of dl-3-n-butylphthalide (NBP) on Rats with Brain Injury*

DUAN Peng¹, GUO Qin-yue², LIU Li¹, LI Xiao-qing¹, BAI Li-xi¹, XU Jing^{1Δ}

(1 Department of Emergency; 2 Department of Critical Care Medicine, The First affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the neuroprotective effect and mechanism of dl-3-n-butylphthalide (NBP) on rats with brain injury. **Methods:** A total of 100 7-week-old male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into 5 groups: sham group, model group, NBP low, medium and high dose groups, 20 in each group. A model of craniocerebral injury in rats was established using controlled cortical impact injury. NBP was dissolved in soybean oil. The low, medium and high dose groups of NBP were orally administered at a dose of 20, 40, and 80 mg / kg for 2 weeks, respectively. The sham group and the model group were orally administered with an equal volume of soybean oil. The modified neurological deficit score (mNSS) was used to evaluate the neurological status of rats. The brain tissue water content and the levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the brain tissues of each group were detected after treatment. TUNEL method was used to identify cell apoptosis. The expressions of Nrf2, NQO-1, HO-1, ApoJ, MMP9, AQP4, Caspase-3 and AKT in brain tissue were detected by RT-PCR, Western blot or Immunohistochemistry. **Results:** After 2 weeks of NBP treatment, the mNSS score and neuron apoptosis rate in the NBP treatment group were significantly reduced in a dose-dependent manner ($P<0.05$). Compared with the model group, the brain water content in the NBP treatment group was significantly reduced ($P<0.05$). Compared with the model group, MDA in the NBP treatment group was significantly reduced, while SOD and GSH-Px were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the nuclear Nrf2 in the NBP treatment group was significantly increased, while the cytoplasmic Nrf2 was significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the expression levels of NQO-1 and HO-1 proteins in the NBP treatment group were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the mRNA and protein expression levels of AQP4, MMP-9, ApoJ, and Caspase-3 in the NBP low, medium, and high dose groups were significantly reduced, while AKT was significantly increased($P<0.05$). **Conclusions:** NBP has a certain neuroprotective effect on rats with traumatic brain injury.

* 基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2018JM7021);西安交通大学第一附属医院基金自由探索项目(2019ZYTS-10)

作者简介:段鹏(1987-),男,硕士研究生,住院医师,研究方向:颅脑损伤及脏器功能保护,E-mail:PiXumei@163.com,电话:17749023896

Δ 通讯作者:许静,E-mail:xlee1977@163.com,电话:13891806577

(收稿日期:2020-02-23 接受日期:2020-03-18)

Key words: dl-3-n-butylphthalide; Traumatic craniocerebral trauma; Antioxidant; Neuronal apoptosis; Cerebral edema

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R651 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)11-2024-08

前言

颅脑外伤(Traumatic brain injury, TBI)不仅会导致脑细胞原发性机械损伤,而且还会引发继发性损伤。在颅脑外伤继发性损伤中,离子稳态丧失、炎症反应、氧化应激等几种病理过程可引起神经元凋亡及脑水肿^[1],其中,氧化应激在继发性损伤中起关键作用^[2]。由氧化应激产生的活性氧产生和内源性抗氧化剂系统失衡会诱导核酸的氧化和DNA的分解,从而进一步导致细胞损伤^[3]。dl-3-正丁基苯酞(3-butyl-1(3H)-Isobenzofuranone, NBP)是一种芹菜籽挥发油中分离出的化合物,先前的研究表明,NBP在治疗脑缺血方面具有较好的效果,NBP可改善局部脑血流量和脑能量代谢^[4]。另外,在实验性诱导的缺血性中风动物模型中,NBP明显降低了脑水肿的严重程度并减少了神经元细胞死亡^[5]。虽然有报道了NBP在治疗脑缺血方面的作用,然而NBP在创伤性颅脑外伤治疗过程中作用仍有待研究。本研究通过建立创伤性颅脑外伤大鼠模型,研究了NBP治疗创伤性颅脑外伤的神经保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

NBP购自美国Sigma公司,将其溶解在大豆油中;RIPA裂解液、Weigert苏木素染色液购自北京索莱宝科技有限公司;聚偏二氟乙烯(PVDF)膜、增强的化学发光(ECL)试剂购自美国Millipore公司;RNAiso Plus和PrimeScript RT试剂盒购自日本TaKaRa公司;细胞核和细胞质蛋白提取试剂盒、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;大豆油购自上海源叶生物科技有限公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒购自北京凯瑞基生物科技有限公司;TUNEL试剂购自上海罗氏制药有限公司;DAB显色剂购自武汉博士德生物工程有限公司。NQO-1、Nrf2、Caspase-3和 β -actin抗体购自美国Santa Cruz Biotechnology公司;MMP9、HO-1及山羊抗兔IgG购自美国Proteintech公司;ApoJ、AQP4和AKT抗体购自美国Cell Signaling Technology公司。

Bio-Rad电泳仪购自美国Bio-Rad公司;颅脑损伤仪购自美国PSI公司;颅脑立体定向仪购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司;显微镜及拍照系统购自日本OLYMPUS公司。ABI 7500型实时荧光定量PCR系统购自美国ABI公司。

100只7周龄清洁级雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠由西安交通大学医学部动物实验中心[SYXK(陕)2018-001]提供,体重240-300g,将大鼠饲养在20-25℃、相对湿度40%-60%、12h光暗周期的实验室内,分笼饲养,每笼5只,不限制饮食。实验之前饲养1周使其适应环境。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及创伤性颅脑外伤大鼠模型的制作 100只大鼠随机分成5组,分别为假手术组(Sham)、模型组(Model)、

NBP低剂量组(L-NBP)、NBP中剂量组(M-NBP)和NBP高剂量组(H-NBP),每组20只。模型组、NBP低剂量组、NBP中剂量组和NBP高剂量组大鼠进行建模。使用控制性皮层撞击损伤建立中型大鼠颅脑损伤模型^[6]。使用3%水合氯醛(10 mL/kg)腹腔内麻醉大鼠,将大鼠固定于颅脑立体定向仪,备皮并消毒后于中线切开头皮,使用磨钻于冠状缝和矢状缝右侧钻一直径约5 mm的孔,保留一薄层颅骨骨质并挑起骨质,避免造成血管和脑组织损伤。通过颅脑损伤仪对大鼠进行硬膜外撞击,探头直径和撞击深度均为3 mm,速度为3.5 m/s,接触时间为0.5 s。然后压迫止血,使用骨蜡封孔后缝合头皮。假手术组大鼠进行相同的造模程序,但不进行硬膜外撞击。

1.2.2 给药处理 将NBP溶解在大豆油中,NBP低剂量组、NBP中剂量组和NBP高剂量组大鼠分别按照每天20、40和80 mg/kg的剂量灌胃,假手术组和模型组灌胃等体积的大豆油,共给药2周。

1.2.3 改良神经功能缺损评分 采用改良神经功能缺损评分(mNSS)对大鼠的神经系统状况进行评价^[7],mNSS评分包含运动试验、感觉试验、平衡木试验及反射缺失及异常活动四个大项,每个大项包含若干小项,最低0分,最高分为18分,分值越高则神经功能损伤越重。

1.2.4 脑组织含水量测量 水合氯醛溶液麻醉大鼠,断头取脑后于挫伤处脑组织中心处冠状切开分离脑组织,用吸水纸充分吸干脑组织水分,然后放置在锡箔纸上测量湿重。之后60℃烘箱烘烤48 h至恒重,然后测量干重。脑组织含水量%=(湿重-干重)/湿重 \times 100%。

1.2.5 苏木精-伊红(HE)染色 将大鼠脑组织石蜡包埋,以脑挫伤最大层面为中心冠状切下3 μ m厚的切片。切片分别用二甲苯I和II脱蜡,梯度乙醇水化,苏木精染色,盐酸酒精分化,伊红染色,脱水、透明、封片后置于显微镜下观察。

1.2.6 细胞凋亡检测 将福尔马林固定的大鼠脑组织包埋在石蜡中,并用切片机以4 μ m的厚度切片。通过TUNEL方法鉴定细胞的凋亡。将切片脱蜡、复水并用蒸馏水洗涤。组织在室温下用20 g/mL蛋白酶K 37℃消化15 min。使用0.3%过氧化氢/甲醇于37℃孵育切片30 min来封闭内源性过氧化物酶活性。然后将切片与1:100比例稀释的生物素化的抗地高辛抗体37℃孵育30 min,然后将切片与1:100比例稀释的SABC-FITC 37℃孵育30 min。切片用DAPI染色液在37℃孵育10 min,洗涤后用抗荧光衰减封片剂封片并置于显微镜下进行观察。阳性凋亡细胞被染为黄绿色荧光颗粒,通过凋亡指数(定义为TUNEL阳性细胞的平均百分比)评估脑损伤的严重程度。

1.2.7 氧化应激指标检测 将脑组织在2 mL的10 mM磷酸盐缓冲液(PBS pH7.4)中匀浆。以10000 r/min离心20 min后,用MDA、SOD和GSH-Px试剂盒测定脑组织上清液中的MDA、SOD和GSH-Px含量。

1.2.8 蛋白质印迹分析 根据细胞核和细胞质蛋白提取试剂

盒的说明提取蛋白,使用 Bradford 方法计算蛋白质浓度后,通过 12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离每条泳道中的蛋白质(30 μg),并转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜中。将膜在封闭缓冲液中封闭 2 h。然后将细胞核蛋白膜分别与 Nrf2 和 Histone H3 一抗 4 °C 孵育过夜,将细胞质膜分别与一抗在 4 °C 孵育过夜:Nrf2、NQO-1、HO-1、ApoJ、MMP9、AQP4、Caspase-3、AKT 和 β-actin(1:1000)。用 TBST(3× 10 min)洗涤后,将膜与辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG(1:2000)室温孵育 2 h。通过增强的化学发光(ECL)蛋白质印迹检测试剂进行显影。β-actin 作为内部对照用于计算目的基因的相对表达量。

1.2.9 qRT-PCR 用 RNAiso Plus 从样品中提取总 RNA。用分光光度计(OD260/280 1.8-2.0)和 1%琼脂糖凝胶电泳测定总 RNA 的浓度和纯度。用 PrimeScript RT 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。引物根据 PubMed GenBank 设计并由美国 Invitrogen 公司合成(表 1)。实时定量 PCR 分析是使用 SYBR® Premix Ex Taq™ II(Tli RNaseH Plus)试剂盒在 ABI Prism7300 型荧光定量 PCR 仪上进行。PCR 扩增程序包括 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 3 s,60 °C 复性并延伸 30 s,40 个循环。β-actin 作为管家基因。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

Primer	Primer sequence
ApoJ	F:5'-GGGTCTGAGACCACAAGGAATG-3'
	R:5'-ATTGAAGACCAGCGGGTGGTA-3'
MMP9	F:5'-AGTGACCCTAACAAAGCCTCGAG-3'
	R:5'-GCGTTGGCATTATCTTTCCATGGA-3'
AQP4	F:5'-ACTTCCCTTGGGGTCATGGAA-3'
	R:5'-GGTTCGGAAACCCACCCTTGTA-3'
Caspase-3	F:5'-GAGACAGTGGACGATCTGACG-3'
	R:5'-GCAAAGTGGATGTGGCGAGA-3'
AKT	F:5'-GGGTGTCAGATGAGCTCACACA-3'
	R:5'-TCCACAATAGAGACCACAGCTC-3'
β-actin	F:5'-ACTTGGTCCCATGGGGTCTAA-3'
	R:5'-GGACCCATTCACCCTTCGGAGTAA-3'

1.2.10 免疫组化 将切片行脱蜡水化,使用柠檬酸缓冲液(pH 6.0)进行高压抗原修复 3 min,冷却后用柠檬酸缓冲液(pH 6.0)高压修复 3 min。然后分别与 ApoJ、MMP9、AQP4、Caspase-3 和 AKT 一抗 27 °C 孵育 60 min,与相应的二抗 27 °C 孵育 30 min。DAB 显色剂室温下显色 5 min,苏木素复染 2 min,1%稀盐酸分化,脱水、透明、封片,显微镜下观察。

1.3 统计学分析

使用 SPSS22.0 软件进行统计分析。每个实验重复至少 3 遍,数据表示为平均值± 标准差。使用单因素方差分析(ANOVA)及 LSD 事后检验比较各组间差异。差异显著性指定为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 NBP 对创伤性颅脑外伤大鼠神经功能的影响

与假手术组比较,模型组大鼠的改良神经功能缺损评分(mNSS)显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,NBP 治疗 2 周后,NBP 低、中和高剂量组大鼠的 mNSS 评分以剂量依赖性方式显著降低($P < 0.05$)。见图 1。

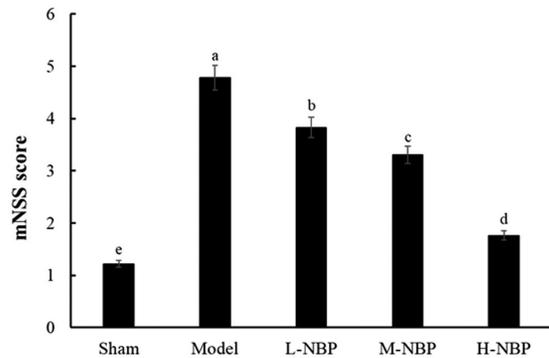


图 1 各组大鼠的改良神经功能缺损评分(mNSS)

Fig.1 Modified neurological deficit scores (mNSS) for each group of rats
Note: Different letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$); The same letters indicate no significant differences between groups ($P > 0.05$).

2.2 NBP 对创伤性颅脑外伤大鼠脑水肿的影响

与假手术组比较,模型组大鼠的脑含水量显著升高。与模型组比较,NBP 低、中和高剂量组大鼠的脑含水量均显著降低($P < 0.05$),但不同剂量组间的脑含水量无显著差异($P > 0.05$)。见图 2。

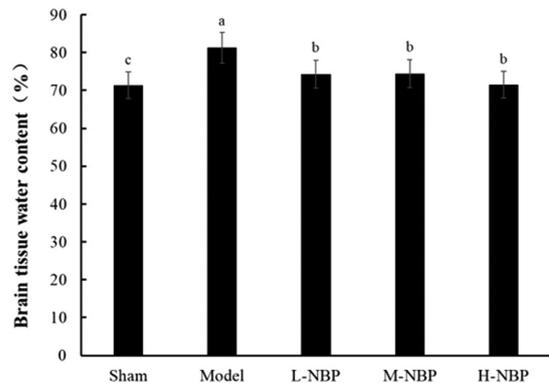


图 2 各组大鼠的脑组织含水量

Fig.2 Brain tissue water content in each group of rats

Note: Different letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$); The same letters indicate no significant differences between groups ($P > 0.05$).

2.3 NBP 对创伤性颅脑外伤大鼠脑组织形态的影响

HE 染色结果显示,假手术组大鼠脑组织排列规则,染色均一,未见细胞肿胀或变性,形态正常。模型组大鼠脑组织可见明显挫伤灶炎性细胞浸润,充血明显,组织排列紊乱,结构疏松,细胞核固缩。NBP 低、中和高剂量组大鼠的上述病变明显减轻,但仍有少量炎性细胞浸润或组织疏松。见图 3。

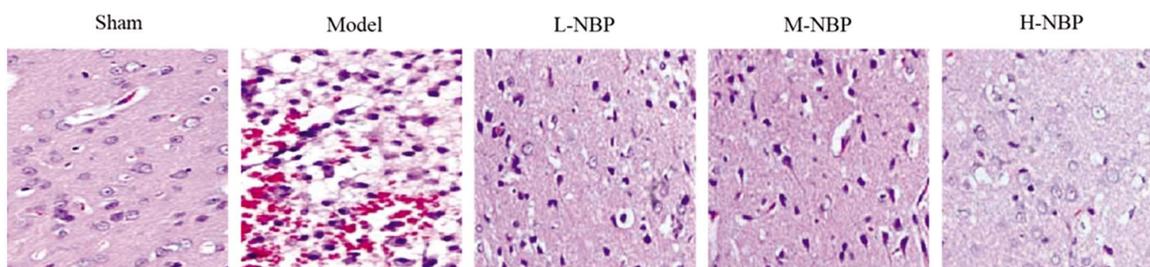


图3 各组大鼠脑组织苏木精-伊红(HE)染色(200×)
Fig.3 Hematoxylin-eosin (HE) staining (200×)

2.4 NBP 对创伤性颅脑外伤大鼠神经元凋亡的影响

TUNEL 染色结果显示, 阳性凋亡神经元被染为黄绿色荧光颗粒, 统计凋亡率结果发现, 与假手术组比较, 模型组大鼠的

神经元凋亡率显著升高($P<0.05$)。与模型组比较, NBP 低、中和高剂量组大鼠的神经元凋亡率以剂量依赖性方式显著降低($P<0.05$)。见图4。

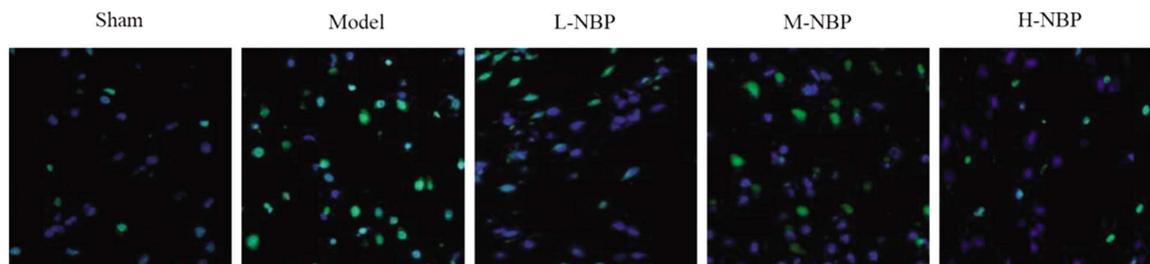
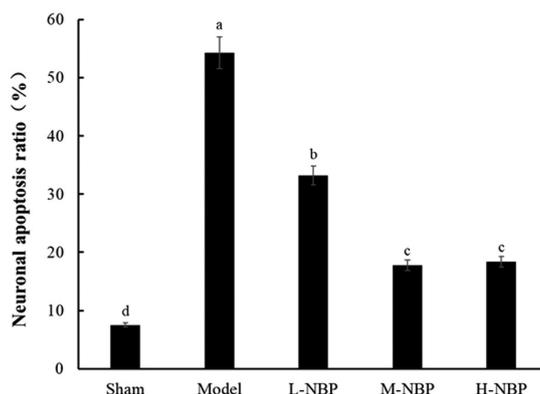


图4 TUNEL 染色检测各组大鼠神经元凋亡(200×)

Fig.4 TUNEL staining to detect neuronal apoptosis in each group of rats (200×)

Note: Different letters indicate significant differences between groups ($P<0.05$); The same letters indicate no significant differences between groups ($P>0.05$).

2.5 NBP 对创伤性颅脑外伤大鼠脑组织氧化应激的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织中 MDA 水平显著升高, 而 SOD 和 GSH-Px 水平显著降低($P<0.05$)。与模型组比较, NBP 低、中和高剂量组大鼠的 MDA 水平显著降低, 而 SOD 和 GSH-Px 水平显著升高, 并且均呈剂量依赖性方式变化($P<0.05$)。见图5。

氧化应激相关调控基因 Nrf2、NQO-1 和 HO-1 的蛋白表达水平结果显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织细胞核 Nrf2 蛋白表达水平显著升高, 而细胞质 Nrf2 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。与模型组比较, NBP 低、中和高剂量组大鼠的细胞核 Nrf2 蛋白表达水平显著升高, 而细胞质 Nrf2 蛋白表达水平显著降低, 并且均呈剂量依赖性方式变化($P<0.05$)。此外, 与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织中 NQO-1 和 HO-1 的蛋白表达水平显著升高。与模型组比较, NBP 低、中和高剂量组大鼠的 NQO-1 和 HO-1 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。见图6。

2.6 NBP 对创伤性颅脑外伤大鼠脑组织中脑损伤相关因子的

影响

RT-PCR、Western blot 和免疫组织结果均显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织中脑损伤相关因子 AQP4、MMP-9 和 ApoJ 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)。与模型组比较, NBP 低、中和高剂量组大鼠的 AQP4、MMP-9 和 ApoJ 的 mRNA 和蛋白表达水平均以剂量依赖性方式显著降低($P<0.05$)。见图7。

2.7 NBP 对创伤性颅脑外伤大鼠脑组织中 AKT 和 Caspase-3 表达的影响

RT-PCR、Western blot 和免疫组织结果均显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织中 Caspase-3 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高, 而 AKT 显著降低($P<0.05$)。与模型组比较, NBP 低、中和高剂量组大鼠的 Caspase-3 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低, 而 AKT 显著升高, 均以剂量依赖性方式($P<0.05$)。见图8。

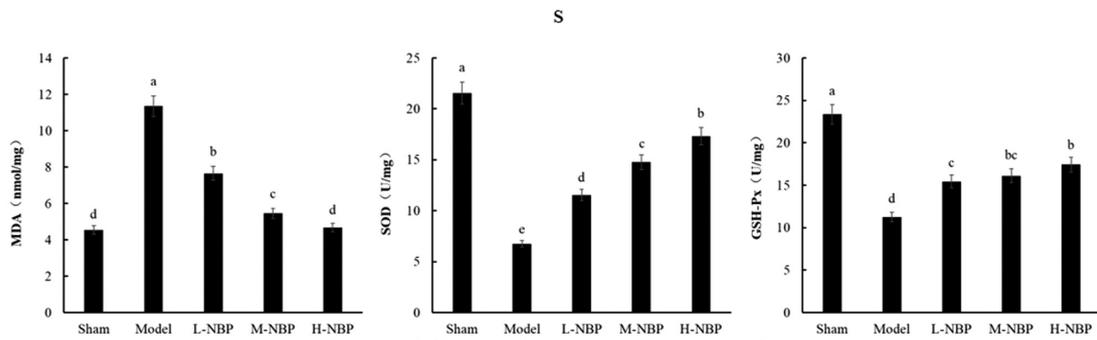


图5 各组大鼠脑组织中MDA、SOD和GSH-Px水平

Fig.5 MDA, SOD and GSH-Px levels in the brain tissue of each group of rats

Note: Different letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$); The same letters indicate no significant differences between groups ($P > 0.05$).

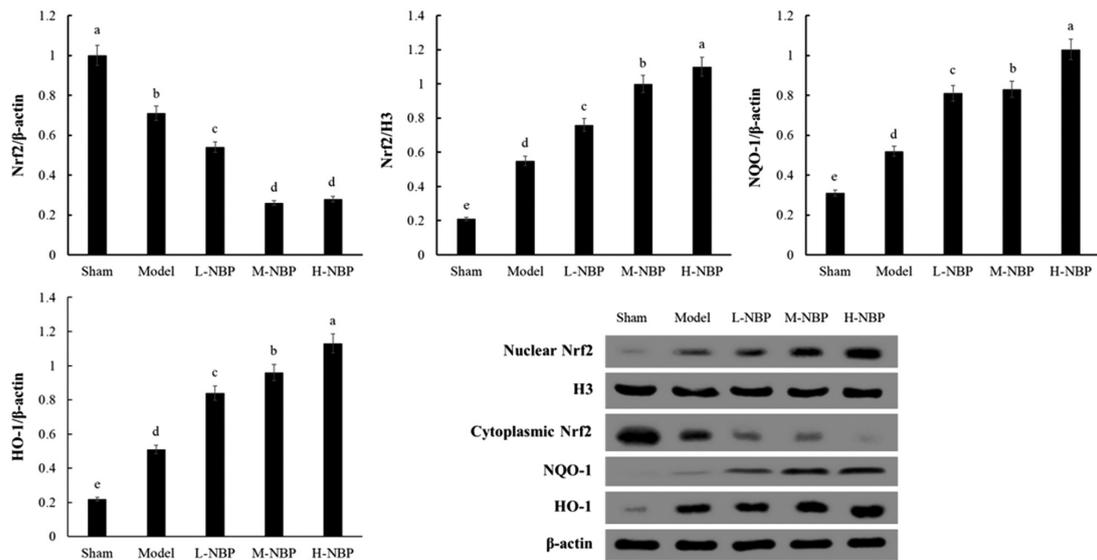


图6 各组大鼠脑组织中Nrf2和NQO-1和HO-1的蛋白表达

Fig.6 Protein expression of Nrf2, NQO-1 and HO-1 in brain tissue of rats in each group

Note: Different letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$); The same letters indicate no significant differences between groups ($P > 0.05$).

3 讨论

目前,NBP在治疗创伤性颅脑外伤中的作用和机制仍有待研究。因此,本研究建立了创伤性颅脑外伤大鼠模型,并使用不同剂量的NBP治疗大鼠2周。治疗后,改良神经功能缺损评分(mNSS)显示,NBP可以剂量依赖性方式显著降低mNSS评分,说明模型大鼠的神经功能得到显著改善。同时,本研究也发现NBP显著减少了模型大鼠脑含水量,以及缓解了挫伤灶的病变程度。为了确定是否可以在组织病理学水平上检测到NBP的神经保护作用,使用TUNEL检查脑组织中的凋亡细胞。发现NBP以剂量依赖性方式抑制了创伤性颅脑外伤引起的神经元凋亡。

颅脑外伤后会产生几种氧化剂及其衍生物,包括超氧阴离子和羟基自由基,活性氧和MDA的产生以及抗氧化酶(例如SOD和GSH-Px)的耗尽会引起氧化应激损伤^[8]。由氧化应激产生的活性氧产生和内源性抗氧化剂系统失衡会诱导核酸的氧化和DNA的分解,从而进一步导致细胞损伤^[9]。为了确定NBP的神经保护作用是否源自其减轻TBI引起的氧化应激的能力,本研究分析了脑组织中膜脂质过氧化损伤标志物MDA,以及负责清除自由基的抗氧化酶SOD和GSH-Px的活性。发现

NBP显著降低了模型大鼠脑组织中MDA水平,并升高了SOD和GSH-Px活性。上述结果说明NBP增加了颅脑外伤后抗氧化酶的活性并抑制了氧化应激损伤,从而发挥脑保护作用。

红系衍生的核因子相关因子2(Nrf2)是在氧化应激中控制细胞氧化还原状态的关键蛋白^[10]。当受损的神经元细胞受到某些保护性因子的刺激时,Nrf2可启动大量基因的转录并抵消氧化应激的有害作用,从而重建细胞内环境稳态。NBP通过其抗氧化特性对神经元具有保护作用,这表明NBP可以作为抗氧化酶的诱导剂。由于Nrf2在抗氧化酶的激活中起关键作用,因此推测NBP可能会激活Nrf2,从而增强抗氧化酶的活性。Nrf2公认的经典激活模式是从细胞质到细胞核的易位。本研究发现,NBP治疗后,创伤性颅脑外伤大鼠脑组织细胞质中的Nrf2表达水平明显降低,而细胞核Nrf2显著升高。说明在颅脑外伤后Nrf2从细胞质到核的转运,NBP进一步促进了这种转运。这一发现与蛋白表达中Nrf2激活的经典模式是一致的,包括从细胞质到细胞核的转运^[11]。在大鼠糖尿病模型和阿尔茨海默病小鼠模型的治疗中发现NBP可诱导Nrf2的高表达,从而增强动物的抗氧化能力并降低氧化损伤^[12]。血红素加氧酶1(HO-1)和NADPH:醌氧化还原酶1(NQO-1)是Nrf2的下游基因,参与调解细胞内氧化还原平衡^[13]。Nrf2途径激活后可诱导其下游

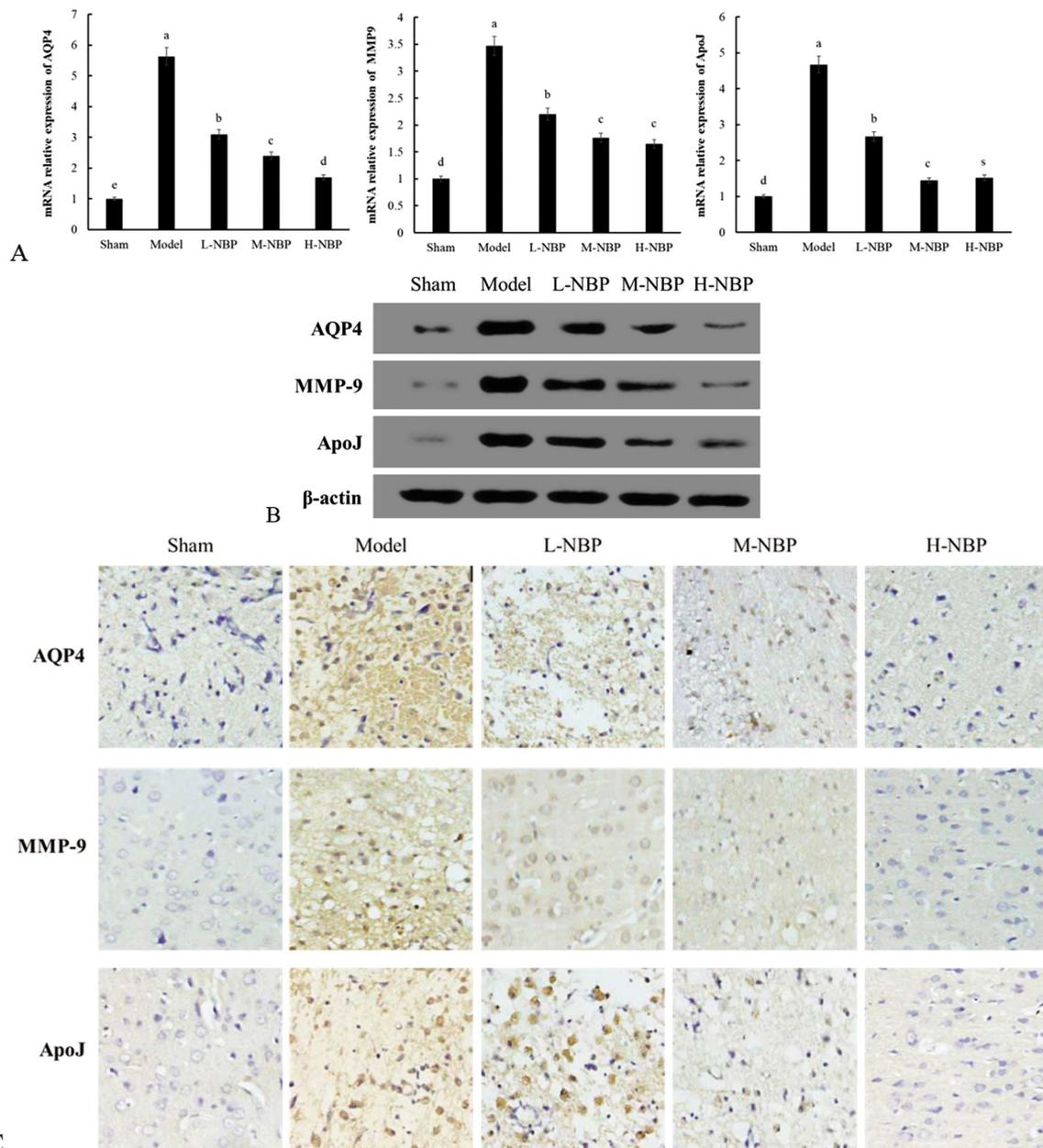


图 7 各组大鼠脑组织中 AQP4、MMP-9 和 ApoJ 的表达

Fig.7 Expression of AQP4, MMP-9 and ApoJ in brain tissue of rats in each group

Note: A: mRNA expression detected by RT-PCR; B: Protein expression detected by Western blot; C: Immunohistochemical staining (200 ×); Different letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$); The same letters indicate no significant differences between groups ($P > 0.05$)

信号 HO-1 和 NQO1 的高表达,从而引起抗氧化功能^[14]。本研究推测 NBP 也可能调节 Nrf2 的下游基因表达。因此,进一步研究了该信号通路中下游因子的表达。研究发现,NBP 治疗后大鼠脑组织中 NQO-1 和 HO-1 的表达水平显著升高,说明 NBP 通过激活 Nrf2 及下游基因来提供机体抗氧化特性。

水通道蛋白 4(AQP4)是神经胶质细胞、血管、脑脊髓液进行水分调运的物质结构,是中枢神经系统中的主要水通道,在维持脑细胞渗透稳态方面具有重要作用^[15]。在大鼠缺血性模型中 AQP4 的表达水平显著升高,而敲除 AQP4 基因可减少颅脑外伤急性期的细胞凋亡,并减轻脑水肿^[16]。基质金属蛋白酶-9(MMP-9)具有降解和重塑细胞外基质动态平衡的功能,在保持血脑屏障完整性中具有重要作用。多项研究发现颅脑外伤、脑

卒中、脑出血后 MMP-9 被显著上调并引起细胞外基质降解,破坏血脑屏障,加剧脑水肿^[17]。而下调 MMP-9 的高表达可以保护血脑屏障并减轻脑水肿^[18]。载脂蛋白 J(ApoJ)是脑组织中参与神经系统发育、免疫调节、突触重构、抗氧化应激、抗细胞凋亡的重要载脂蛋白^[19]。正常情况下,ApoJ 保持较低水平,但发生颅脑外伤后 ApoJ 蛋白表达显著增加^[20]。本研究发现,NBP 治疗以剂量依赖性方式显著降低了大鼠脑组织中 AQP4、MMP-9 和 ApoJ 的 mRNA 和蛋白表达,从而减轻了脑水肿。

正常生理情况下 Caspase-3 是以无活性的酶原形式存在于细胞质中,当受到颅脑损伤后可导致 Caspase-3 发生裂解而活化,从而引起细胞凋亡^[21]。而抑制 Caspase-3 则可显著抑制神经细胞凋亡^[22]。AKT 又被称为蛋白激酶 B(PKB),当 AKT 被激

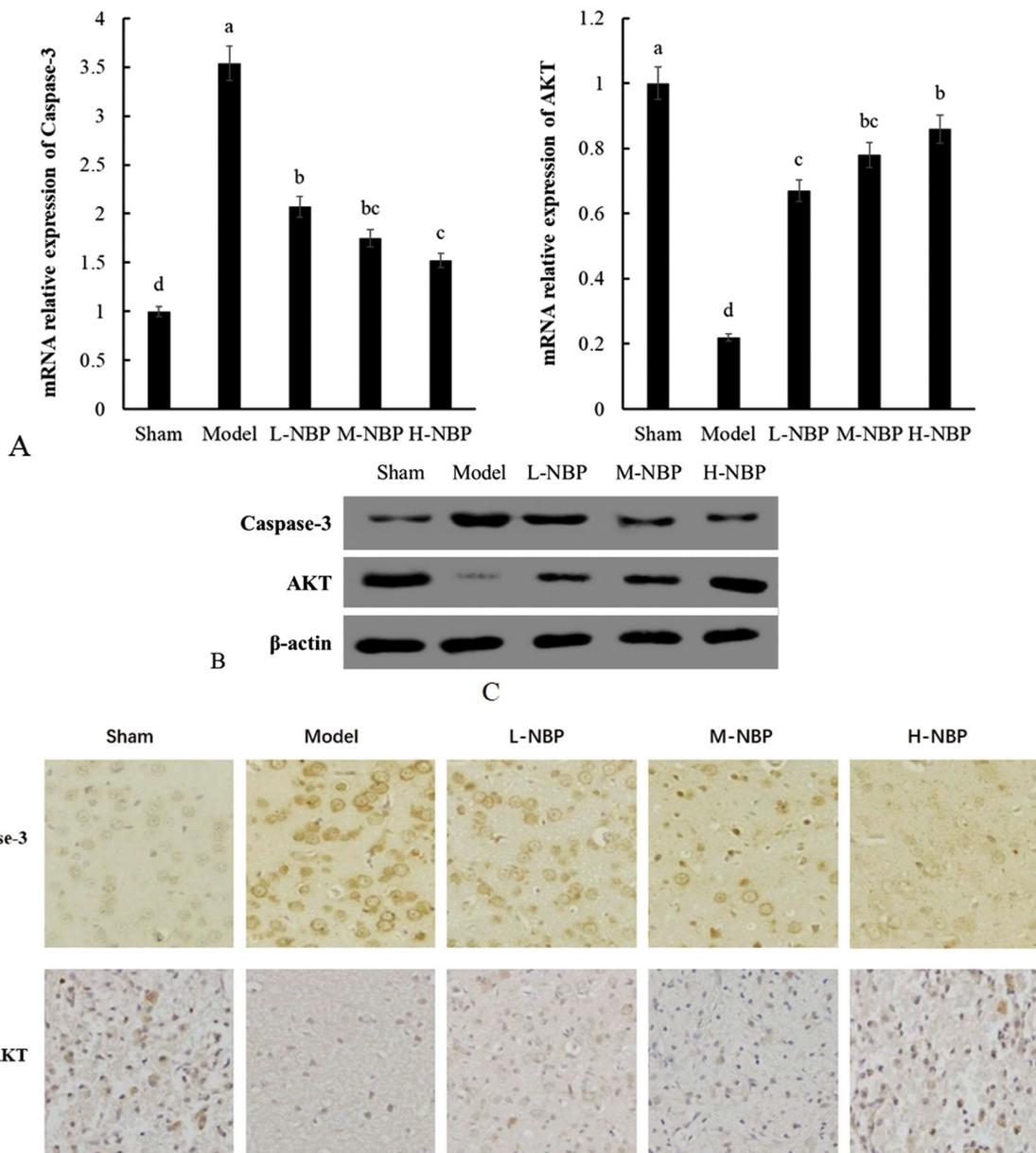


图8 各组大鼠脑组织中 AKT 和 Caspase-3 的表达

Fig.8 Expression of AKT and Caspase-3 in brain tissue of rats in each group

Note: A: mRNA expression detected by RT-PCR; B: Protein expression detected by Western blot; C: immunohistochemical staining (200 \times);

Different letters indicate significant differences between groups ($P < 0.05$); The same letters indicate no significant differences between groups ($P > 0.05$)

活后,磷酸化的 AKT 通过激活或抑制下游靶蛋白促进细胞存活,其中包括 Caspase-3,因此,AKT 信号通路是细胞内重要的抗凋亡通路^[23]。本研究发现 NBP 治疗以剂量依赖性方式抑制了颅脑外伤大鼠脑组织中 Caspase-3 的表达,并激活了 AKT 信号通路,从而抑制了神经元凋亡。

综上所述,本研究表明 NBP 通过激活 Nrf2 和 AKT 信号通路,抑制 AQP4、MMP-9 和 ApoJ 的表达提高抗氧化活性、抑制神经元凋亡并减轻脑水肿,从而对创伤性颅脑外伤大鼠提供神经保护作用。

参考文献(References)

[1] 林堃,魏德,林元相. 颅脑外伤早期挫裂伤脑组织类帕霉素靶蛋白异常激活[J].中华实验外科杂志,2019,36(8): 1381-1383
 [2] 张玉琴,朱旭强,吴力新,等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对脑损伤小鼠认知和氧化应激的影响 [J]. 中华实验外科杂志,2018,35(3):

475-477

[3] Ding K, Xu J, Wang H, et al. Melatonin protects the brain from apoptosis by enhancement of autophagy after traumatic brain injury in mice [J]. Neurochem Int, 2015, 91: 46-54
 [4] 陈雅静,吴云成. 丁苯酚对神经系统疾病的保护作用研究进展[J].国际神经病学神经外科学杂志,2019,46(3): 337-341
 [5] Sun B, Feng M, Tian X, et al. dl -3-n-Butylphthalide protects rat bone marrow stem cells against hydrogen peroxide-induced cell death through antioxidation and activation of PI3K-Akt pathway [J]. Neuroscience letters, 2012, 516(2): 247-252
 [6] Osier N, Dixon C E. The controlled cortical impact model of experimental brain trauma: overview, research applications, and protocol [M]//Injury Models of the Central Nervous System. Hu mana Press, New York, NY, 2016: 177-192

- [7] Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic Benefit of Intravenous Administration of Bone Marrow Stromal Cells After Cerebral Ischemia in Rats[J]. *Stroke*, 2001, 32(4): 1005-1011
- [8] Wang H C, Lin YJ, Shih F Y, et al. The role of serial oxidative stress levels in acute traumatic brain injury and as predictors of outcome [J]. *World neurosurgery*, 2016, 87: 463-470
- [9] Ding K, Xu J, Wang H, et al. Melatonin protects the brain from apoptosis by enhancement of autophagy after traumatic brain injury in mice[J]. *Neurochemistry International*, 2015, 91: 46-54
- [10] 陈江生, 陈保东, 凌毕益, 等. 葛根素通过 Nrf2-ARE 信号通路抵抗氧化应激对创伤性脑损伤的神经保护作用 [J]. *卒中与神经疾病*, 2017, 24(2): 91-94
- [11] Ding K, Wang H, Xu J, et al. Melatonin stimulates antioxidant enzymes and reduces oxidative stress in experimental traumatic brain injury: the Nrf2-ARE signaling pathway as a potential mechanism [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, 73: 1-11
- [12] Wang C Y, Wang Z Y, Xie J W, et al. DL-3-n-butylphthalide-induced upregulation of antioxidant defense is involved in the enhancement of cross talk between CREB and Nrf2 in an Alzheimer's disease mouse model [J]. *Neurobiology of aging*, 2016, 38: 32-46
- [13] Zhang M, An C, Gao Y, et al. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection [J]. *Prog Neurobiol*, 2013, 100: 30-47
- [14] Li L, Dong H, Song E, et al. Nrf2/ARE pathway activation, HO-1 and NQO1 induction by polychlorinated biphenyl quinone is associated with reactive oxygen species and PI3K/AKT signaling [J]. *Chem Biol Interact*, 2014, 209: 56-67
- [15] Cartagena C M, Phillips K L, Tortella F C, et al. Temporal alterations in aquaporin and transcription factor HIF1 α expression following penetrating ballistic-like brain injury (PBBi) [J]. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2014, 60: 81-87
- [16] Liang F, Luo C, Xu G, et al. Deletion of aquaporin-4 is neuroprotective during the acute stage of micro traumatic brain injury in mice[J]. *Neuroscience letters*, 2015, 598: 29-35
- [17] Guilfoyle M R, Carpenter K L H, Helmy A, et al. Matrix metalloproteinase expression in contusional traumatic brain injury: a paired microdialysis study [J]. *Journal of neurotrauma*, 2015, 32 (20): 1553-1559
- [18] 唐兆华, 廖正步, 石全红, 等. p38 信号通路对大鼠 8 脑创伤后 MMP-9 的表达及脑水肿形成的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2012, 32(7): 928-931
- [19] Camacho J, Moliné T, Ramón y Cajal S, et al. Brain ApoA-I, ApoJ and ApoE immunodetection in cerebral amyloid angiopathy [J]. *Frontiers in neurology*, 2019, 10: 187
- [20] Huang Z, Cheng C, Jiang L, et al. Intraventricular apolipoprotein ApoJ infusion acts protectively in Traumatic Brain Injury [J]. *Journal of neurochemistry*, 2016, 136(5): 1017-1025
- [21] Wang Y, Gao W, Shi X, et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin [J]. *Nature*, 2017, 547 (7661): 99-103
- [22] 于士柱, 严莉, 王虔, 等. 半胱氨酸蛋白酶 -3 抑制剂对大鼠缺血再灌注脑区神经元凋亡的影响 [J]. *中华病理学杂志*, 2006, 35(3): 165-170
- [23] Le Pen J, Laurent M, Sarosiek K, et al. Constitutive p53 heightens mitochondrial apoptotic priming and favors cell death induction by BH3 mimetic inhibitors of BCL-xL [J]. *Cell death & disease*, 2016, 7 (2): e2083

(上接第 2075 页)

- [22] 许立敏. 妇科千金片联合桂枝茯苓丸治疗慢性盆腔炎的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(11): 3003-3006
- [23] 秦艺珊, 石博伦, 虞济森, 等. 妇科千金片治疗慢性盆腔炎有效性及安全性的系统评价 [J]. *天津中医药大学学报*, 2018, 37(5): 427-432
- [24] 李妞妞, 王铁延, 张丽萍. 金刚藤辅助妇科千金片治疗慢性盆腔炎的临床效果[J]. *宁夏医科大学学报*, 2018, 40(1): 65-68
- [25] Gao X, Hao L, Wang J, et al. Effect of Phacoemulsification Combined with Intraocular Lens Implantation on Inflammatory Factors, Oxidative Stress Response and Hemorheology in Diabetic Cataract Patients[J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2018, 28(10): 762-765
- [26] Siemieniuch MJ, Szóstek AZ, Gajos K, et al. Type of Inflammation Differentially Affects Expression of Interleukin 1 β and 6, Tumor Necrosis Factor- α and Toll-Like Receptors in Subclinical Endometriosis in Mares[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0154934
- [27] Kosmopoulos M, Christofides A, Drekolias D, et al. Critical Role of IL-8 Targeting in Gliomas [J]. *Curr Med Chem*, 2018, 25 (17): 1954-1967
- [28] Deme D, Telekes A. Prognostic importance of plasma C-reactive protein (CRP) in oncology[J]. *Orv Hetil*, 2017, 158(7): 243-256
- [29] Galli E, Hartmann FJ, Schreiner B, et al. GM-CSF and CXCR4 define a T helper cell signature in multiple sclerosis [J]. *Nat Med*, 2019, 25 (8): 1290-1300
- [30] Ushach I, Zlotnik A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage[J]. *J Leukoc Biol*, 2016, 100(3): 481-489