

· 实验研究 ·

基于核因子 NF-E2 相关因子/血红素氧合酶-1 信号通路研究丁苯酞对糖尿病脑小血管病大鼠的作用机制

牟肖莉,王 波,赵 娟,于金凤
(烟台市烟台山医院,烟台 264000)

[摘要] **目的:**通过核因子 NF-E2 相关因子(Nrf2)/血红素氧合酶-1(HO-1)信号通路研究丁苯酞治疗糖尿病脑小血管病大鼠的作用机制。**方法:**将建模成功的糖尿病脑小血管病大鼠随机分为丁苯酞治疗组和模型组,行水迷宫实验,取材后石蜡切片染色、脱水封片,显微镜观察大鼠大脑皮质的组织学结构及该区域神经元细胞的组织病理学改变;应用 Western blot 法检测脑组织 Nrf2/HO-1 信号通路中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达。**结果:**水迷宫实验 d 1~d 4,与模型组相比,丁苯酞治疗组大鼠定位航行实验逃避潜伏期逐渐缩短。脑组织镜下观察,与模型组相比,丁苯酞治疗组大鼠脑组织细胞排列规则、细胞核饱满圆润、固缩现象减少。Western blot 法检测发现,与模型组相比,丁苯酞治疗组大鼠脑组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达增高。**结论:**丁苯酞治疗组大鼠脑组织中 Nrf2 和 HO-1 增加,表明丁苯酞可能通过上调抗氧化应激蛋白的表达发挥脑保护作用。

[关键词] 脑小血管病;糖尿病大鼠;核因子 NF-E2 相关因子/血红素氧合酶-1 信号通路;丁苯酞
[中图分类号] R971 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)14-1467-05

Study of the mechanism of action of DL-3-N-butylphthalide on cerebral small vessel disease in diabetic rats based on Nrf2/HO-1 signaling pathway

MOU Xiao-li, WANG Bo, ZHAO Juan, YU Jin-feng
(Yantai Shan Hospital, Yantai 264000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the mechanism of action of DL-3-N-butylphthalide (NBP) on cerebral small vessel disease in diabetic rats based on Nrf2/HO-1 signaling pathway. **Methods:** The successfully modeled diabetes rats with cerebrovascular disease were randomly divided into NBP treatment group and model group. The water maze test was carried out. After taking the materials, paraffin sections were stained, dehydrated and sealed. The histological structure of the rat cerebral cortex and the histopathological changes of neurons in this area were observed under a microscope. The expressions of Nrf2 and HO-1 protein in Nrf2/HO-1 signal pathway of brain tissue were detected by Western blot. **Results:** Compared with the model group, the escape latency of the rats in the NBP-treated group was shortened gradually on the 1st-4th day in the water maze test. Compared with the model group, the cells of brain tissue in the NBP-treated group were arranged regularly, the nuclei were full and round, and the pyknosis was decreased. Western blot analysis showed that Nrf2 and HO-1 protein expression in the brain tissue of rats treated with NBP was higher than that of the model group. **Conclusion:** Nrf2 and HO-1 were increased in the brain tissue of NBP-treated rats, and NBP may play a protective role in the brain by up-regulating the expression of anti-oxidative stress protein.

[Key words] cerebral small vessel disease; diabetic rats; Nrf2/HO-1 signal pathway; DL-3-N-butylphthalide

[作者简介] 牟肖莉,女,副主任医师,研究方向:内分泌与代谢病。E-mail:yt_mxl@163.com。

[通讯作者] 王波,女,主任医师,研究方向:内分泌与代谢病。E-mail:wbyt-001@163.com。

脑小血管疾病 (cerebral small vessel disease, CSVD) 是一组涉及大脑小动脉、微动脉、毛细血管、微静脉和小静脉的缺血性或出血性疾病的总称^[1]。很多机制参与脑小血管病的发病,氧化应激是缺血性脑损伤的主要机制之一^[2]。机体在产生氧化应激的同时,体内的内源性抗氧化系统也被激活,从而抑制氧化应激造成的损伤,使机体处于平衡状态。核因子 NF-E2 相关因子 (Nrf2) 是细胞氧化应激反应中的关键因子,通过与抗氧化反应元件 (ARE) 相互作用调节编码抗氧化蛋白 Nrf2 和血红素氧合酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1)。正常生理条件下, Nrf2 存在于细胞质内,通过与抑制蛋白 Keap1 解离后通过细胞核孔进入细胞核,并与核内 ARE 上的特异性位点结合,启动二相解毒酶和抗氧化酶基因的表达^[3],见图 1。

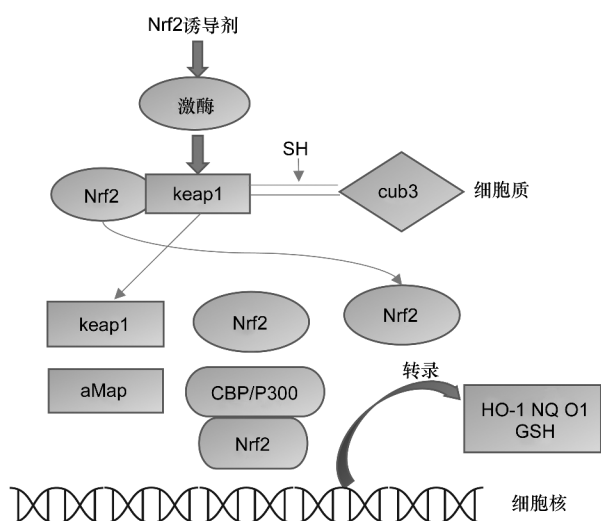


图 1 Nrf2 抗氧化应激机制示意图

丁苯酞 (*DL-3-N-butylphthalide*, NBP) 的主要成分是 D1-3*N*-正丁基苯胺,可改善脑循环、有效抑制机体合成氧自由基,增强氧化酶的活性,改善急性缺血性脑血管病患者神经功能缺损^[4-6]。但是,丁苯酞脑保护作用的具体机制尚不明确。本研究将实验大鼠采用同种系微栓子体外注入法建立脑小血管病模型,通过丁苯酞进行干预,研究丁苯酞是否通过上调 Nrf2/HO-1 信号通路中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达发挥脑保护作用,报道如下。

材料与方 法

1 材料

1.1 实验动物 健康雄性 SD 大鼠 30 只,7~8 周

龄,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,动物生产许可证号:SCXK(鲁)2014-0007。饲养环境:维持温度(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,平均湿度(55 ± 5)%,12 h 明暗周期,自由进食及饮水,适应性饲养 1 周,实验过程符合《实验动物饲养和使用条例》。

1.2 材料及主要试剂 喂养大鼠高脂高糖饲料(猪油 10 kg、蔗糖 20 kg、胆固醇 2.5 kg、普通饲料 67.5 kg 混匀后压制而成);糖尿病建模试剂:链脲佐菌素 (streptozocin, STZ, 美国西格玛公司,生产批号:SigmaS0130);恩必普(丁苯酞软胶囊, NBP, 石药控股集团有限公司,生产批号:518141001,纯度:99.6%)。

2 方法

2.1 分组及建模 雄性 SD 大鼠 30 只适应性喂养 1 周后,根据随机数字表法分为正常对照组 ($n = 10$)、模型组 ($n = 10$)、治疗组 ($n = 10$)。正常对照组大鼠常规饲料喂养,模型组及治疗组大鼠采用高脂高糖饲料喂养,1 个月后,腹腔注射 STZ $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,注射 STZ 3 d 后开始检测血糖,血糖连续 2 d 均高于 $16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 认定糖尿病模型造模成功。注射 STZ 1 周后,采用同种系微栓子体外注入法,参照 Tanaka 等^[7]方法,以大鼠出现痫样发作、肢体瘫痪及异常运动确定为脑小血管病造模成功。模型组和治疗组大鼠全部造模成功。

治疗组按设计剂量给予 NBP 灌胃 (*ig*) 给药治疗 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),设计剂量依据 NBP 说明书中患者的治疗剂量,按照患者体重 60 kg 计算得出的每天每公斤的药物剂量。开始给药的时间为研究始点 (d1),每日 *ig* 给药,治疗 2 周后进行 Morris 水迷宫实验,末次给药后 24 h 采集血液和尿液样本。研究终点处死大鼠,取出大鼠大脑皮层区组织,固定后石蜡包埋,制备蜡块切片进行后续实验。

2.2 Morris 水迷宫实验 实验中水迷宫水温保持在 (25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,定位航行于每天上午 10 点开始进行,在全部定位航行实验完成后 24 h 进行空间探索实验,把平台移除,让大鼠在原来平台对侧象限入水,在泳池中游泳 60 s,记录大鼠游泳的路线,计算通过原来平台的次数和在原来平台象限的时间百分比。连续 5 d,休息 1 周后再重复定位航行实验 1 次。

2.3 取材 每组大鼠随机分成 2 批,每批 5 只,给予 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉。第 1 批大鼠直接开颅取脑,取右侧大脑半球海马区脑组织,分成小块分装入做好标记的冻存管,液氮保存,用于 Western blot 等检测。第 2 批大鼠注入 4% 多聚甲醛灌流后

取脑,取脑后将灌流后的脑组织置于 10% 福尔马林置 4 ℃ 冰箱内进行后固定,时间 > 2 h,然后制作成蜡块切片。

2.4 脑组织形态学实验 石蜡切片入 Harris 苏木素染色(G1150,Solarbio) 3~8 min,自来水洗,1%的盐酸酒精分化数秒,切片入伊红染液中染色 1~3 min。脱水封片,Olympus BX51 型显微镜(日本 Olympus 公司)镜检($\times 200$),观察 3 组大鼠大脑皮质的组织学结构及该区域神经元细胞的组织病理学改变,采集图像。

2.5 Western blot 方法检测大鼠脑组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达 取脑组织,研磨加入蛋白提取试剂,提取总蛋白;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:PC0020,Solarbio 公司)检测蛋白浓度;Western blot 检测脑组织中 Nrf2 (1:1 000,批号:ab76026,abcam 公司)和 HO-1 (1:1 000,批号:ab68477,abcam 公司)蛋白表达。

3 统计学分析

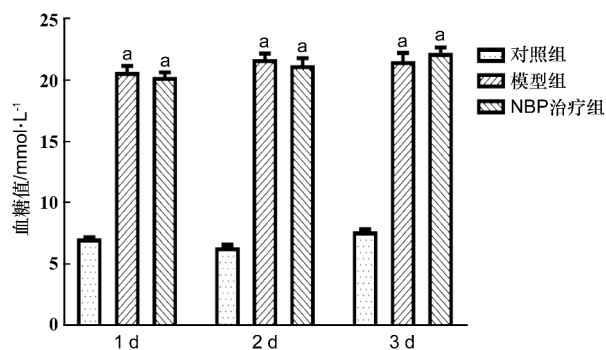
应用 SPSS 20.2 软件处理各组数据,各组数据均为平均值 \pm 标准差,采用 One-Way ANOVA 法分析各组实验数据之间的差异。 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性, $P < 0.01$ 表示差异具有极显著性。

结 果

1 糖尿病合并脑小血管病模型建立

喂养 1 个月高脂高糖饲料后,腹腔给予 STZ,3 d

后检测建模组血糖值,发现连续 2 d 血糖值高于 $16.7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,1 周后通过同种系微栓子体外注入法建立脑小血管病,大鼠出现肢体瘫痪等症状,见图 2。

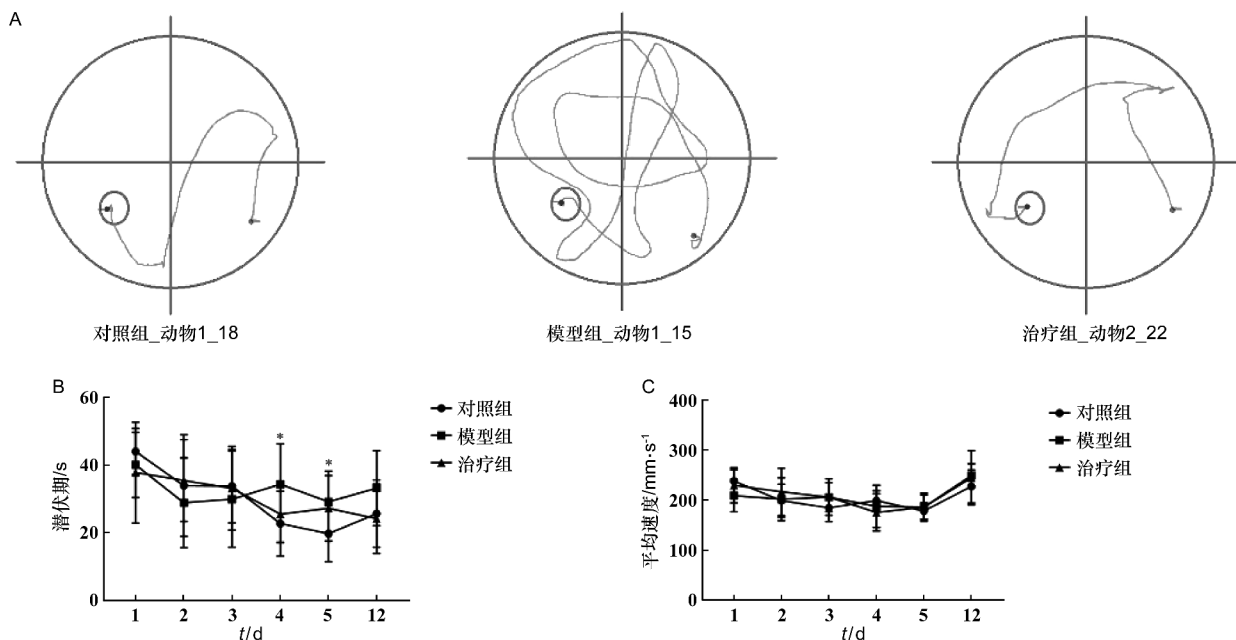


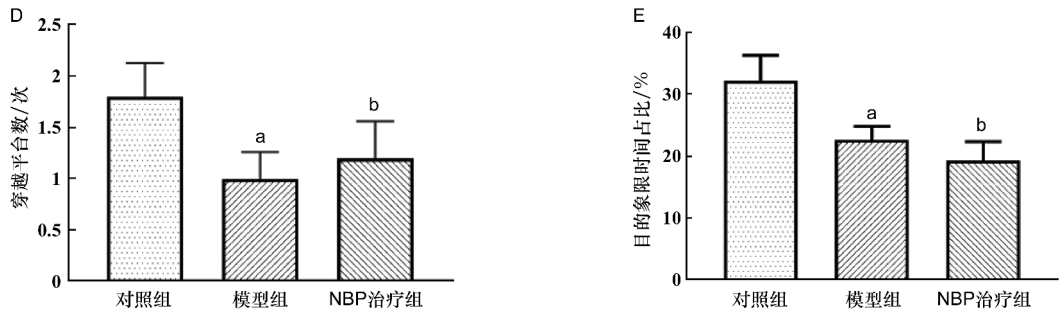
与对照组比较, a: $P < 0.01$

图 2 注射 STZ 后 3 组大鼠连续 2 d 血糖值变化 ($n = 10$)

2 Morris 水迷宫实验

经过训练后,对照组大鼠和治疗组逃避潜伏期逐渐减少;d 4 结果显示,对照组逃避潜伏期时间最短,其次是治疗组,模型组逃避潜伏期最长;1 周后结果显示,治疗组与对照组大鼠逃避潜伏期相当,与模型组相比明显缩短 ($P < 0.05$),说明治疗组大鼠的学习能力强于模型组 ($P < 0.05$)。3 组大鼠的游泳速度结果无显著差异 ($P > 0.05$)。与对照组相比,模型组穿越平台数和平台时间占比显著减少,治疗组穿越平台数较模型组增加,但无统计学意义,见图 3。





A:动物水迷宫轨迹图;B:定位航行实验潜伏期;C:定位航行实验游泳速度;D:空间探索实验穿越平台数;E:空间探索实验目的象限时间占比;与对照组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$

图3 水迷宫实验结果

3 脑组织形态学实验

正常组脑组织细胞排列规则,细胞核饱满圆润;模型组细胞排列较为紊乱,细胞核有固缩现象;治疗

组相对于模型组,脑组织细胞核相对饱满圆润,固缩现象减少。见图4。

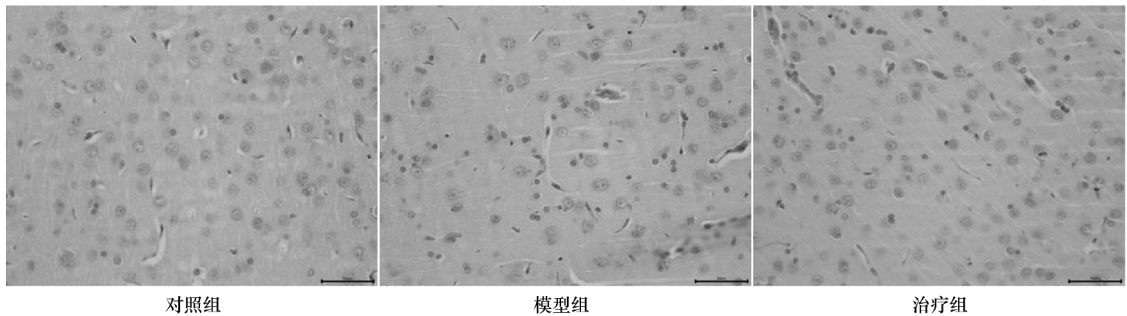
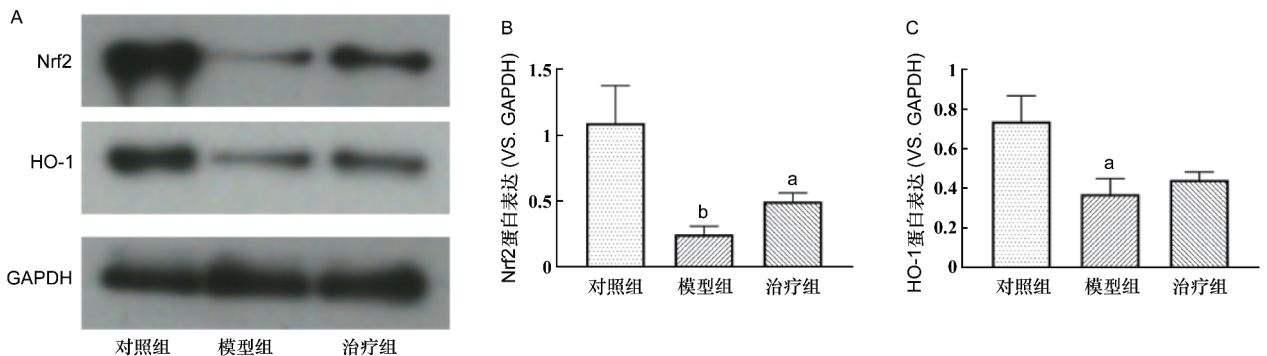


图4 脑组织 HE 染色结果(400 ×)

4 脑组织 Nrf2/HO-1 信号通路中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达

应用 Western blot 法检测 Nrf2/HO-1 信号通路蛋白表达,见图5A。实验结果显示,模型组脑组织

中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达显著低于对照组 ($P < 0.01$),治疗组脑组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达高于模型组,但无统计学差异,见图5B和图5C。



A:Western blot 图; B:Nrf2 蛋白表达;C:HO-1 蛋白表达;与对照组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$

图5 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达

讨 论

脑小血管疾病的死亡率和致残率并不高,但它严重危害了患者的生活质量^[8-10]。大量的国内和国际研究证实,脑小血管疾病与中风后抑郁、认知和运动障碍密切相关,糖尿病被认为是脑小血管疾病的独立危险因素^[11-15]。糖尿病合并脑小血管病的患病率明显高于非糖尿病患者。

脑小血管疾病的发病机制很多,目前有很多机制参与脑小血管病的发病,氧化应激是缺血性脑损伤的主要病理生理机制之一^[2]。近几年研究认为,Keap1-Nrf2-ARE 信号通路是迄今发现的最为重要的内源性抗氧化应激通路之一^[16],并证实了 Nrf2 在脑出血、脑外伤、缺血性脑血管病等多种神经系统疾病中起着神经保护作用^[17-19]。

近期在糖尿病合并脑小血管病变模型研究发现,通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路可抑制氧化应激引起的脑细胞、缺血半暗带损伤和胰岛素抵抗,可改善糖尿病合并脑小血管病。

本实验以大鼠空腹血糖连续 2 d 均高于 16.7 mmol·L⁻¹ 确认糖尿病模型成功,参照 Tanaka 等^[7]方法,以大鼠出现癫痫样发作、肢体瘫痪及异常运动确定为脑小血管病造模成功,且脑小血管病可引起学习能力及记忆功能下降,本研究中模型组与治疗组大鼠逃避潜伏期较对照组显著增加,空间穿越次数较对照组显著减少,此结果说明两组大鼠学习能力及记忆能力下降,符合脑小血管病的临床特征;其次脑小血管病可引起海马与皮质中乙酰胆碱(Ach)含量下降,本研究结果符合脑小血管疾病特征,说明本研究糖尿病合并脑小血管疾病模型建立成功。

本实验结果显示,与模型组相比,治疗组大鼠脑组织细胞核相对饱满圆润,固缩现象减少,空间定位航行实验的逃避潜伏期缩短,虽然没有达到统计学意义,但提示 NBP 治疗 2 周后,可以改善脑小血管病大鼠的认知功能障碍和定向障碍。与模型组相比,治疗组大鼠脑组织中 Nrf2 表达明显增加,HO-1 蛋白表达呈增加趋势。Nrf2 和 HO-1 是细胞内抗氧化应激蛋白,通过启动二相解毒酶和抗氧化酶基因的表达,达到抗氧化应激的作用。由此本研究分析,NBP 可能通过上调脑组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达来改善大鼠脑细胞功能。

本实验由于样本量不足或实验时间较短,与模型组相比,NBP 治疗在改善大鼠逃避潜伏期和提高

大鼠脑组织 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达没有取得统计学意义,有待今后更加完善实验设计(致谢:本研究动物实验在百吉林生命科学研究所以完成,恩必普由石药集团恩必普药业有限公司提供)。

[参 考 文 献]

- [1] WARDLAW JM, SMITH C, DICHGANS M. Mechanisms of sporadic cerebral small vessel disease: insights from neuroimaging [J]. *Lancet Neurol*, 2013, 12(5): 483-497.
- [2] 潘晓帆,徐运. 氧化应激与缺血性卒中[J]. 国际脑血管病杂志, 2010, 18(3): 231-235.
- [3] YU X, KENSLE T. Nrf2 as a target for cancer chemoprevention [J]. *Mutat Res*, 2005, 591(1-2): 93-102.
- [4] DU R, TENG JF, WANG Y, et al. Clinical study of Butylphthalide combined with Xue Shuan Tong on serum inflammatory factors and prognosis effect of patients with cerebral infarction [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2015, 28(5 Suppl): 1823-1827.
- [5] YING QI, DAI F, TANG W, et al. Clinical efficacy of sequential therapy for butylphthalide combined with alteplase in the treatment of acute cerebral infarction [J]. *Chin J Primary Med Pharm*, 2017, 24(8): 1231-1234.
- [6] YING QI, DAI F, TANG W, et al. Clinical efficacy of sequential therapy for butylphthalide combined with alteplase in the treatment of acute cerebral infarction [J]. *Chin J Primary Med Pharm*, 2017, 24(8): 1231-1234.
- [7] TANAKA N, KATAYAMA Y, KATSUMATA T, et al. Effects of long-term administration of HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, on stroke events and local cerebral blood flow in stroke-prone spontaneously hypertensive rats [J]. *Brain Res*, 2007, 1169: 125-132.
- [8] ARBA F, INZITARI D, ALI M, et al. Small vessel disease and clinical outcomes after IV rt-PA treatment [J]. *Acta Neurol Scand*, 2017, 136(1): 72-77.
- [9] LIANG Y, CHEN YK, MOK VC, et al. Cerebral small vessel disease burden is associated with poststroke depressive symptoms: a 15-month prospective study [J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10: 46.
- [10] HATATE J, MIWA, MATSUMOTO M, et al. Association between cerebral small vessel diseases and mild parkinsonian signs in the elderly with vascular risk factors [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2016, 26: 29-34.
- [11] DEANE R, BELL R, SAGARE A, et al. Clearance of amyloid- β peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in alzheimers disease [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2009, 8(1): 16-30.
- [12] HARDY J, SELKOE DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics [J]. *Science*, 2002, 297(5580): 353-356.
- [13] MORROW JA, ARNOLD KS, DONG J, et al. Effect of arginine 172 on the binding of apolipoprotein E to the low density lipoprotein receptor [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(4): 2576-2580.
- [14] GAUTHIER S, REISBERG B, ZAUIDIG M, et al. Mild cognitive impairment [J]. *Lancet*, 2006, 367(9518): 1262-1270.
- [15] MIAO JT, XU F, DAVIS J, et al. Cerebral microvascular amyloid beta protein deposition induces vascular degeneration and neuroinflammation in transgenic mice expressing human vasculotropic mutant amyloid beta precursor protein [J]. *Am J Pathol*, 2005, 167(2): 505-515.
- [16] YU X, KENSLE T. Nrf2 as a target for cancer chemoprevention [J]. *Mutat Res*, 2005, 591(1-2): 93-102.
- [17] JIN W, ZHU L, GUAN Q, et al. Influence of Nrf2 genotype on pulmonary NF-kappaB activity and inflammatory response after traumatic brain injury [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2008, 38(3): 221-227.
- [18] VARGAS MR, JOHNSON JA. The Nrf2-ARE cytoprotective pathway in astrocytes [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2009, 11: e17.
- [19] 任安歌,高雅然,许莉莉,等. 丁苯酞治疗血管性认知障碍动物模型涉及信号通路研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2023, 32(9): 902-905.

编辑:杨青/接受日期:2023-01-20

