

· 综述 ·

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

任安歌^{1,3},高雅然^{3,4},许莉莉^{2,3},胡明^{5,6}

(1 河北医科大学研究生院,石家庄 050011; 2 河北北方学院研究生院,张家口 075000; 3 河北省人民医院神经内科,石家庄 050051; 4 河北医科大学神经病学教研室,石家庄 050017; 5 河北医科大学第一医院,石家庄 050030; 6 首都医科大学宣武医院河北医院,石家庄 050024)

[摘要] 血管性认知障碍(VCI)是指由脑血管病变或其相关危险因素所致的一组认知障碍疾病,主要临床特征为认知功能障碍以及注意力、记忆力及执行力等的降低,严重者表现为血管性痴呆。DL-3-正丁基苯酞(NBP)是一种可用于改善血管性认知障碍的药物,能够增加海马神经元存活数量、促进神经突触形成、利于脑血管再生、调控细胞凋亡等,可起到改善神经功能的作用。近年,关于DL-3-正丁基苯酞治疗血管性认知障碍的作用机制的文献越来越多,以下将对目前已被研究发现的一些DL-3-正丁基苯酞发挥治疗作用时涉及的信号通路及其机制进行系统阐述,为进一步对防治血管性认知障碍的研究提供参考和支持。

[关键词] DL-3-正丁基苯酞;血管性认知障碍;PI3k/Akt信号通路;Shh/Ptch1信号通路;JNK/p38 MAPK信号通路

[中图分类号] R964 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)09-0902-04

The signal pathway involved in the treatment of vascular cognitive impairment in rats by butylphthalide

REN An-ge^{1,3}, GAO Ya-ran^{3,4}, XU Li-li^{2,3}, HU Ming^{5,6}

(1 Graduate School of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China; 2 Graduate School of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China; 3 Department of Neurology, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang 050051, China; 4 Department of Neurology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 5 The First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050030, China; 6 Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Hebei Hospital, Shijiazhuang 050024, China)

[Abstract] Vascular cognitive impairment (VCI) refers to a group of cognitive disorders caused by cerebrovascular disease or its related risk factors. The main clinical characteristics include cognitive dysfunction, with reduction of attention, memory and executive ability, and in severe cases, vascular dementia. DL-3-N-butylphthalide (NBP) is used to improve vascular cognitive impairment. It can increase the survival number of hippocampal neurons, promote synaptic formation, facilitate cerebrovascular regeneration, regulate cell apoptosis, thus exert a therapeutic effect of nerve function improvement. In recent years, more and more literatures was reported on the mechanism of NBP in the treatment of vascular cognitive impairment. This article will systematically elaborate the signal pathway and mechanism involved in the treatment of NBP that have been found so far, so as to provide reference and support for the further research on the prevention and treatment of vascular cognitive impairment.

[Key words] DL-3-N-butylphthalide; vascular dementia; PI3k/Akt signal pathway; Shh/Ptch1 signal pathway; JNK/p38 MAPK signal pathway

[作者简介] 任安歌,女,硕士研究生,研究方向:血管性认知障碍。E-mail:rl5232176072@163.com。

[通讯作者] 胡明,女,副主任/副主任医师,研究方向:血管性认知障碍。E-mail:minghu@aliyun.com。

在痴呆型疾病中,血管性认知障碍(vascular cognitive impairment, VCI)被认为是继阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)后的第2类最常见的疾病^[1],亦由于其可预防可治疗,因此在各国学者中引起越来越多的关注和研究。

DL-3-正丁基苯酞(DL-3-N-butylphthalide, NBP)是中国首次发现的一种小分子化合物,由芹菜种子提取,在临床上可用于防治脑缺血^[2]。NBP可发挥多种保护作用,如阻止海马神经元持续受损,减少细胞凋亡,促进脑血管、血流再生及改善神经认知功能等^[3],并具有普遍认可的安全性。近年来,已有不少研究在该领域从分子生物学方向取得了一些进展,如PI3k/Akt信号通路、Shh/ptch1信号通路、Nrf-2/HO-1信号通路、JNK/p38 MAPK信号通路及TLR4/NF- κ B信号通路等,具体如下。

1 PI3k/Akt 信号通路

细胞凋亡是细胞结束生命活动的一种程序性死亡方式,小鼠脑缺血再灌注之后的钙离子超载、自由基蓄积及炎症反应都可引起细胞的凋亡发生。而NBP治疗VCI的作用途径之一是调控细胞的凋亡,因此关于NBP发挥治疗作用的过程中是否涉及与抗凋亡作用密切相关的PI3k/Akt信号通路也有不少研究。

PI3k/Akt信号通路在脑中广泛存在并可发挥重要的抗细胞凋亡作用从而保护脑功能^[4]。PI3k是一种磷酸激酶,Akt是一种蛋白激酶。在PI3k/Akt信号通路中,PI3k活化后可使Akt蛋白磷酸化,Akt活化后通过影响下游靶蛋白而产生对细胞的凋亡、迁移等过程的调节作用,除此之外该通路还具有营养代谢和促血管生成的作用^[5-6]。Xiong等^[7]对新生儿缺氧缺血性脑病(neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)进行研究后指出,PI3k/Akt信号通路被抑制后可诱导研究对象发生缺血缺氧后神经元凋亡的现象,其途径为使血小板衍生生长因子停止表达。

还有研究表明抗凋亡蛋白/促凋亡蛋白的比值越大,细胞存活的可能性越大^[8]。在细胞凋亡的调控中,抗凋亡蛋白Bcl-2主要由原癌基因编码,促凋亡蛋白主要由凋亡因子Bax下游基因表达,两者之间的平衡关系与细胞凋亡密切相关。Peng等^[9]通过大鼠全脑缺血后进行双侧股动脉的远程缺血后处理(RIPoC)最后再灌注的实验发现,远程缺血处理后的大鼠抗凋亡蛋白Bcl-2与凋亡因子Bax的比例

明显增高,并与对照组相比海马CA1区的Akt和pAkt的表达水平也明显增高,凋亡细胞因此减少,RIPoC后再灌注的大鼠的学习记忆能力也明显改善,表明RIPoC是通过激活PI3k/Akt信号通路发挥对全脑缺血再灌注所致脑损伤的保护作用。另Chen等^[10]研究表明,凋亡时Caspase会被激活,Caspase属天冬氨酸性蛋白酶中的一种。而在Caspase凋亡通路中Caspase 3是最主要的凋亡因子。Akt活化后通过促进或抑制上述凋亡相关因子的表达产生抑制凋亡的作用。而据Yang等^[11]研究表明,适当浓度的NBP可显著增强Bcl-2的表达并降低Bax的表达,从而发挥抑制凋亡、保护神经功能的作用。上述研究均证明NBP在发挥治疗VCI的作用过程中确有涉及PI3k/Akt信号通路。

2 Shh/Ptch1 信号通路

海马组织主要负责大脑的学习、记忆力,海马突触蛋白在其中具有重要作用,若其结构与功能改变,则海马的认知功能就会受到影响。Niu等^[5]研究发现Shh/Ptch1信号通路的各指标含量在VCI模型大鼠海马区域均有下降,由此说明该通路参与了VCI的发生发展;而在给予VCI模型大鼠NBP后Shh/Ptch1信号通路被不同限度激活,海马神经元的持续受损被阻止,并加速突触的形成,大鼠的认知功能进而受到改善。还有证据也表明大鼠海马组织中的Shh/Ptch1信号通路在VCI的形成过程中具有重要作用,除与该通路具有抗氧化应激、调节细胞生长、保护血管内皮、促血管再生等作用外^[3],与具有促轴突重塑、神经发生的作用亦有关,此通路被激活后可产生促大脑重塑的作用^[12]。

彭丽等^[13]研究发现在大鼠脑部发生缺血性损伤后Shh蛋白表达水平明显升高,海马区神经重塑速度加快,但在给Shh蛋白表达水平升高后的大鼠给予环巴胺抑制剂后,海马区的神经重塑速度又会降低,并在分别给予脑缺血再灌注大鼠外源性重组Shh蛋白和抑制剂环巴胺的实验组中发现,外源性重组Shh蛋白组的大鼠脑梗死区域明显减少,受损区域血管再生和神经干细胞增殖加速。

Niu等^[5]通过双侧颈总动脉结扎大鼠模型实验表明,大鼠在给予NBP治疗后的认知功能明显改善,Western blot法检测结果显示NBP治疗组与模型组相比Shh, Ptch1, Smo, Gli1蛋白表达水平均明显升高。并通过Morris水迷宫观察到NBP治疗组大鼠的空间学习记忆能力明显改善,HE染色结果也

显示 NBP 治疗组大鼠海马区神经元形态较模型组相比明显改善,且 NBP 浓度越高的治疗组神经元形态改善得越明显,并发现 NBP 剂量不同 Shh/Ptch1 信号通路激活的程度也不同,证明该通路在 NBP 治疗 VCI 时具有重要的作用。

3 Nrf2/HO-1 信号通路

氧化应激的本质是内源性氧化酶与机体内的活性氧之间产生过多失衡引起的内部反应^[14],可引起机体内不可逆的损伤。戴蓉芳等^[15]和 Mittal 等^[16]研究表明,在 VCI 的发生发展过程中,脑部缺血缺氧所引起的氧化应激损伤对该过程的形成具有重要的推动作用。Nrf2/HO-1 信号通路则可在 VCI 形成过程中起到抗氧化应激的作用。NBP 可通过激活此通路起到抗氧化应激进而改善脑部缺血缺氧损伤的作用。

已有研究证明 Nrf2/HO-1 通路是细胞防御机制中最重要的一种^[17]。Nrf2 是核转录因子,广泛存在于体内组织细胞,据研究得知,Nrf2 可通过促进抗氧化酶转录表达减轻脑部缺血再灌注后氧化应激引起的继发性神经组织细胞损伤^[18]。血红素加氧酶 HO-1,一种自由基清除剂,可降低大脑损伤部位的氧化应激水平,由 Nrf2 激活并入核后启动其下游基因表达产生^[19]。故推测 NBP 的抗氧化应激作用可能与激活该通路有关。而据 Qi 等^[20]研究证明,NBP 确可显著增强 Nrf2 的表达,与此同时,NBP 也增强了 HO-1 的表达。由此可合理推知,NBP 发挥抗氧化应激、保护脑功能作用的机制包括 Nrf2/HO-1 信号通路的激活。

4 JNK/p38 MAPK 信号通路

李磊等^[21]研究表明,JNK/p38MAPK 通路的激活可引发脑缺血损伤后脑部神经功能的损害,其途径主要是通过调控炎症因子和一氧化氮等信号。NBP 对脑缺血再灌注损伤大鼠的神经保护作用之一为抑制炎症反应,故而推测 NBP 发挥保护作用与激活 JNK/p38MAPK 通路相关。

JNK 与 p38MAPK 皆为 MAPK 家族主要成员,两者皆可由炎症反应中的细胞因子如 IL-1b,ICAM-1, TNF- α 调控,当这些细胞因子减少时 JNK/p38MAPK 信号通路激活则会受到抑制,信号通路受到抑制之后会正反馈式地使下游细胞因子 IL-1b, ICAM-1, TNF- α 释放减少,从而抑制炎症反应^[22]。

余霞等^[23]研究发现,对比局灶性脑缺血再灌注组大鼠和假手术组大鼠的脑组织蛋白 Western blot 检

测结果显示,局灶性脑缺血再灌注组的 p-NF- κ B 和 p-p38MAPK 蛋白表达水平明显比假手术组的更高,说明局灶性脑缺血再灌注可使 NF- κ B 和 p38MAPK 表达激活,进而引起下游细胞因子的释放增加,促进炎症反应。NBP 发挥神经保护作用、抑制脑缺血后炎症反应是通过抑制 p38MAPK 和 NF- κ B 的表达,从而产生抑制 JNK/p38MAPK 通路的促神经损害作用。

另外,Guan 等^[24]研究发现,p38MAPK 还可通过其他途径增加脑损伤,如加速细胞凋亡、促氧化应激损伤、抑制 Nrf2 的表达等。库亚萍等^[25]通过 TUNEL 染色法观察大鼠海马 CA1 区神经元发现,局灶性脑缺血模型组大鼠海马 CA1 区神经元的 TUNEL 染色阳性比例大于 NBP 模型组,而 NBP 组大鼠海马 CA1 区神经元的 TUNEL 染色阳性比例又明显大于假手术组。且通过 RT-PCR 法检测各组大鼠海马组织 BaX, Bcl-2, p38 及 MAPK 的 mRNA 表达量发现,假手术组的 BaX, p38 及 MAPK 的 mRNA 表达量明显低于模型组和 NBP 模型组, Bcl-2 的 mRNA 表达量明显高于后 2 组;而在后两组间,NBP 模型组大鼠海马组织的 BaX, p38 以及 MAPK 的 mRNA 表达量低于模型组, Bcl-2 mRNA 的表达量高于模型组大鼠,说明局灶性脑缺血再灌注使大鼠 p38MAPK 表达激活后,还可进一步引起凋亡相关因子的释放增加、抗凋亡蛋白 Bcl-2/促凋亡蛋白 BaX 的比值降低,促进神经细胞凋亡,而 NBP 可通过抑制 p38 和 MAPK 的表达减少凋亡相关因子的释放、提高 Bcl-2/BaX 的比值,从而起到抑制神经细胞的凋亡、恢复大脑功能的保护作用。

5 TLR4/NF- κ B 信号通路

TLR4/NF- κ B 信号通路是海马组织炎症反应中的经典通路,此外该通路还参与细胞免疫应答及抗凋亡相关基因的表达^[26]。TLR4 在脑部缺血缺氧后激活 NF- κ B 的途径是识别革兰阴性菌后与其脂多糖部分结合^[27],NF- κ B 被激活后,可使促炎性因子释放增加同时使抑炎性因子释放减少,最终加重炎症反应^[28]。Zhang 等^[29]通过大鼠实验得出的结果表明,NBP 减轻脑损伤的作用或是通过下调 TLR4,使 NF- κ B 等去磷酸化,进而使 IL-1b, IL-18 等促炎因子释放受到抑制,从而抑制炎症反应。

6 结语

据研究报道,患者患 VCI 后的平均生存期在血管性认知障碍人群中较短,而在阿尔茨海默病以及

认知功能正常的人群中则较长,因此早预防、早发现、早治疗对提高 VCI 患者生活质量和生存期都至关重要。

综上所述,对信号通路及病理机制的研究越透彻,则对 VCI 的靶向治疗越有帮助,因此,国内外关于 VCI 靶向治疗的研究热度一直不减,目前已发现的信号通路除关于细胞凋亡、自噬、氧化应激和炎症反应以外,还有细胞焦亡等,而可通过作用于信号通路来治疗 VCI 的药物除 NBP 外还有白桦脂酸、虾青素、三七总皂苷、雷公藤红素、白藜芦醇等。另一方面,由于 NBP 较为复杂的多靶点治疗机制,其衍生物的研究也层出不穷,并发现 NBP 及其衍生物除在对 VCI 有良好的疗效之外对其他一些疾病亦有疗效^[30-31]。因此,在 NBP 及其衍生物对神经系统疾病或其他疾病发挥治疗作用机制方面的研究还需在未来进行深入探索。

[参 考 文 献]

[1] HAN Y, ZHOU AH, LI FY, *et al.* Apolipoprotein E ϵ 4 allele is associated with vascular cognitive impairment no dementia in Chinese population[J]. *J Neurol Sci*, 2020, 409: 116606.

[2] 何浩, 杨文明, 胡建鹏, 等. 丁苯酞在血管性认知功能障碍中的作用及研究进展[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2018, 16(10): 1374-1377.

[3] 牛小莉, 楚宝, 刘志娟, 等. 丁苯酞对血管性痴呆大鼠 Shh/Ptch1 通路的影响[J]. *中国新药杂志*, 2020, 29(18): 2141-2147.

[4] KIM C, PARK S. IGF-1 protects SH-SY₅Y cells against MPP⁺-induced apoptosis via PI3K/PDK-1/Akt pathway [J]. *Endocr Connect*, 2018, 7(3): 443-455.

[5] NIU XL, JIANG X, XU GD, *et al.* DL-3-n-butylphthalide alleviates vascular cognitive impairment by regulating endoplasmic reticulum stress and the Shh/Ptch1 signaling-pathway in rats[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8): 12604-12614.

[6] 蔡亮, 张炳东. PI3K/AKT 信号通路在脑缺血再灌注损伤中的作用及研究进展[J]. *广西医科大学学报*, 2021, 38(10): 2012-2016.

[7] XIONG LL, XUE LL, JIANG Y, *et al.* Suppression of PDGF induces neuronal apoptosis after neonatal cerebral hypoxia and ischemia by inhibiting P-PI3K and P-AKT signaling pathways[J]. *Brain Res*, 2019, 1719: 77-88.

[8] DURONIO V. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway[J]. *Biochem J*, 2008, 415(3): 333-344.

[9] PENG B, GUO QL, HE ZJ, *et al.* Remote ischemic postconditioning protects the brain from global cerebral ischemia/reperfusion injury by up-regulating endothelial nitric oxide synthase through the PI3K/Akt pathway[J]. *Brain Res*, 2012, 1445: 92-102.

[10] CHEN HH, NING XH, JIANG ZF. Caspases control antiviral innate immunity[J]. *Cell Mol Immunol*, 2017, 14(9): 736-747.

[11] YANG XD, CEN ZD, CHENG HP, *et al.* L-3-n-butylphthalide protects HSPB₈ K141N mutation-induced oxidative stress by modulating the mitochondrial apoptotic and Nrf2 pathways[J]. *Front Neurosci*, 2017, 11: 402.

[12] HE WL, CUI LL, ZHANG C, *et al.* Sonic hedgehog promotes neurite outgrowth of primary cortical neurons through up-regulating BDNF expression [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(4):

687-695.

[13] 彭莉, 林晓峰, 王胜, 等. Shh/Gli1 信号通路在异氟醚后处理减轻大鼠脑缺血-再灌注损伤中的作用[J]. *临床麻醉学杂志*, 2020, 36(4): 381-386.

[14] TALIB WH, AL-ATABY IA, MAHMUD AI, *et al.* The impact of herbal infusion consumption on oxidative stress and cancer: the good, the bad, the misunderstood [J]. *Molecules*, 2020, 25(18): 4207.

[15] 张薇, 王英, 尉娜. 丁苯酞胶囊联合银杏达莫注射液治疗老年血管性痴呆的疗效及对认知功能、氧化应激的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2020, 18(3): 515-518.

[16] 戴蓉芳, 徐明然, 冯月英, 等. 晚发型阿尔茨海默病和血管性痴呆老年患者血清同型半胱氨酸、尿酸以及氧化应激水平分析[J]. *医学研究杂志*, 2018, 47(9): 73-75, 89.

[17] MITTAL R, KUMAR A, SINGH DP, *et al.* Ameliorative potential of rutin in combination with nimesulide in STZ model of diabetic neuropathy: targeting Nrf2/HO-1/NF- κ B and COX signaling pathway[J]. *Inflammopharmacology*, 2018, 26(3): 755-768.

[18] DESHMUKH P, UNNI S, KRISHNAPPA G, *et al.* The Keap1-Nrf2 pathway: promising therapeutic target to counteract ROS-mediated damage in cancers and neurodegenerative diseases[J]. *Biophys Rev*, 2017, 9(1): 41-56.

[19] 张丽华, 陈燕, 范莹莹, 等. 苦参水提物激活 Nrf2/HO-1 信号通路抑制炎症和氧化应激机制研究[J]. *中草药*, 2020, 51(1): 157-162.

[20] QI QQ, XU J, LV PY, *et al.* DL-3-n-butylphthalide alleviates vascular cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion by activating the Akt/Nrf2 signaling pathway in the hippocampus of rats[J]. *Neurosci Lett*, 2018, 672: 59-64.

[21] 李磊, 高绚照, 马连萍, 等. 积雪草苷通过激活 PI3K/Akt 信号通路缓解局灶性脑梗死大鼠脑组织损伤和诱导血管新生[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(17): 2068-2072, 2078.

[22] CHENG CY, TANG NY, KAO ST, *et al.* Ferulic acid administered at various time points protects against cerebral infarction by activating p38 MAPK/p90RSK/CREB/bcl-2 anti-apoptotic signaling in the subacute phase of cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0155748.

[23] 余霞, 刘建琴, 姜朝丽, 等. 柴黄清胰活血方对重症急性胰腺炎肺损伤模型大鼠 JNK/P38MAPK 信号通路的影响[J]. *中药药理与临床*, 2021, 37(5): 85-92.

[24] GUAN HL, XIE SY, ZHANG F, *et al.* The involvement of p38MAPK in the rat model of lower-extremity arterial ischemia-reperfusion injury[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(17): 5659-5664.

[25] 库亚萍, 周盛年. 丁苯酞对大鼠局灶性脑缺血再灌注后 NF- κ B 与 p38MAPK 表达的影响[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2018, 26(3): 150-153.

[26] 虞鹏, 陈伟明, 刘先保, 等. TAK-242 对脂多糖诱导的脓毒症脑病小鼠学习记忆功能障碍的改善作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(4): 646-652.

[27] KUZMICH NN, SIVAK KV, CHUBAREV VN, *et al.* TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and Sepsis[J]. *Vaccines*, 2017, 5(4): 34.

[28] 周玉嘉, 张允岭, 周晶, 等. 三七总皂苷对脑缺血再灌注大鼠 TLR4/NF- κ B 信号通路及炎症细胞因子的影响[J]. *中国中医急症*, 2021, 30(8): 1340-1344.

[29] ZHANG P, GUO ZF, XU YM, *et al.* N-Butylphthalide (NBP) ameliorated cerebral ischemia reperfusion-induced brain injury via HGF-regulated TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83: 658-666.

[30] 陈瑶, 周德生, 颜思阳, 等. 三七通舒胶囊联合丁苯酞治疗脑梗死的通用分子机制研究[J]. *世界中医药*, 2021, 16(7): 1045-1053.

[31] 肖海燕, 杨淑贤, 韩雯, 等. 丁苯酞及其衍生物药理学研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(13): 3425-3431.

编辑:刘卓越/接受日期:2023-02-17

