

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.08.009

丁基苯酞对创伤性脑损伤模型大鼠神经功能的改善作用*

何云, 桂水清, 黄贤健, 朱栋梁

(广东省深圳市第二人民医院, 广东 深圳 518035)

摘要:目的 探讨丁基苯酞(NBP)对创伤性脑损伤(TBI)模型大鼠神经功能的改善作用,以及对 IRE1/XBP1 信号通路的影响。方法 将 60 只大鼠分为假手术组、模型组,以及 NBP 高、中、低剂量组(40,20,10mg/kg),各 12 只。采用改良 Feeney 自由落体撞击法复制大鼠 TBI 模型。建模后,各组大鼠腹腔注射相应药物,每天 1 次,持续 7 d。评估大鼠神经功能缺损情况;测定大鼠脑组织含水量;采用 TUNEL 法评估大鼠脑细胞凋亡情况,并计算凋亡指数;采用酶联免疫吸附(ELISA)法测定大鼠脑组织匀浆中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平;采用聚合酶链式反应(PCR)法测定蛋白激酶 C 受体 1(RACK1)、磷酸化 IRE1(p-IRE1)、X-box 结合蛋白 1(XBP1)、葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)水平。结果 与模型组比较,NBP 高、中、低剂量组大鼠神经功能缺损评分,细胞凋亡指数,MDA, p-IRE1, XBP1, GRP78 水平均显著降低;SOD 和 RACK1 水平均显著升高,脑组织含水量显著增加($P < 0.05$)。结论 NBP 对 TBI 模型大鼠神经功能有一定改善作用,其机制与抑制 IRE1/XBP1 信号通路有关。

关键词:丁基苯酞;创伤性脑损伤;神经功能;IRE1/XBP1 信号通路;作用机制

中图分类号:R965;R971

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)08-0032-04

Effect of dl-3-n-Butylphthalide on the Improvement of Neurological Function in Rats with Traumatic Brain Injury

HE Yun, GUI Shuiqing, HUANG Xianjian, ZHU Dongliang

(Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen, Guangdong, China 518035)

Abstract: Objective To investigate the effect of dl-3-n-butylphthalide(NBP) on the improvement of neurological function in rats with traumatic brain injury(TBI) and the effect on IRE1/XBP1 signaling pathway. **Methods** A total of 60 rats were divided into sham operation group, model group, NBP high-dose, medium-dose and low-dose groups(40,20,10 mg/kg), 12 rats in each group. TBI model of rat was established by the modified Feeney's free falling method. After modeling, rats in each group were intraperitoneally injected with corresponding drugs once a day for 7 d. The neurological deficit of rats was evaluated, the brain water content was measured, the apoptosis of brain cells was evaluated by the TUNEL method and the apoptosis index was calculated. The levels of malondialdehyde(MDA) and superoxide dismutase(SOD) in brain homogenate were measured by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). The levels of protein kinase C receptor 1(RACK1), phosphorylated IRE1(p-IRE1), X-box binding protein 1(XBP1) and glucose-regulated protein 78(GRP78) were determined by polymerase chain reaction(PCR). **Results** Compared with those in the model group, the neurological deficit score, apoptosis index, the levels of MDA, p-IRE1, XBP1 and GRP78 were significantly decreased, while the levels of SOD and RACK1 were significantly increased, and the brain water content was significantly increased in NBP high-dose, medium-dose and low-dose groups($P < 0.05$). **Conclusion** NBP has an improvement effect on the neurological function of TBI rats, and its mechanism may be related to its inhibition of IRE1/XBP1 signaling pathway.

Key words: dl-3-n-butylphthalide; traumatic brain injury; neurological function; IRE1/XBP1 signaling pathway; mechanism of action

创伤性脑损伤(TBI)已成为严重的公共卫生问题,但目前尚缺乏有效的治疗方法^[1]。除了在创伤事件发生后立即发生原发性机械损伤外,还会继发脑损伤神经细

胞死亡^[2]。在中枢神经系统(CNS)中,蛋白激酶 C 受体 1(RACK1)可募集并结合许多激酶和受体,从而达到保护神经细胞的目的^[3]。近端内质网应激传感器肌醇酶 1

*基金项目:广东省深圳市科技计划项目[JCYJ20180228163034627]。

第一作者:何云,女,硕士研究生,主治医师,研究方向为重症医学,(电子信箱)396979031@qq.com。

randomized clinical trial[J]. International Journal of Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2017, 55(7):601-606.

[14] 林 凤,肖 莉,盛熹宣,等.右美托咪定联合帕瑞昔布钠超前镇痛在老龄患者髋关节手术中的应用[J].中国实验诊断学,2019,29(6):281-283.

[15] 张 涛,卢 林.帕瑞昔布钠超前镇痛联合 PCIA 应用于腹

腔镜直肠癌根治术老年患者镇痛效果研究[J].现代中西医结合杂志,2017,26(20):2259-2261.

[16] 刘 洋,王 生,韩庆波,等.帕瑞昔布对胸腔镜肺叶切除术患者围术期镇痛效果、氧化应激反应及免疫功能的影响[J].临床肺科杂志,2018,23(7):142-145.

(收稿日期:2020-02-12;修回日期:2020-08-28)

(IRE1)信号通路的激活也可通过 RACK1 的直接结合而触发^[4]。激活的 IRE1 通过编码转录因子 X-box 结合蛋白 1(XBP1)发挥作用,并协调如葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)等未折叠蛋白反应(UPR)基因的表达^[5]。有研究表明,IRE1/XBP1 信号通路在 CNS 疾病中可预防神经细胞凋亡。低表达的 XBP1 可抑制神经细胞中淀粉样 β 神经毒性,而 XBP1 的过表达会触发帕金森病模型小鼠中多巴胺能神经细胞的变性^[6-7]。丁基苯酚(NBP)已被批准用于预防脑缺血^[8],但尚不清楚 NBP 是否对 TBI 模型大鼠的神经功能有改善作用,本研究中拟就此问题进行探讨。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

仪器:HBS-1096B 型酶标仪(南京德铁实验设备有限公司);ASP300S 型组织脱水机、1150 型包埋机、RM2255 型全自动轮转切片机(德国 Leica 公司);E400 型光学显微镜(日本 Nikon 公司);GelDoc-It2 310 型凝胶成像仪(美国 UVP 公司);165-8033 型垂直电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

试剂:NBP(美国 Sigma 公司);苏木素染色液(上海碧云天生物技术研究);TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术公司);超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒,均购自上海生工生物工程有限公司;蛋白抽提试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);RACK1、磷酸化 IRE1(p-IRE1)、XBP1、GRP78、 β -actin 抗体(美国 Santa Cruz 公司);纯化山羊抗小鼠 IgG 二抗(武汉艾美捷科技有限公司);水为纯化水。

动物:SD 大鼠,雄性,体质量(200 ± 20)g,购自吉林大学实验动物中心,动物生产许可证号为 SCXK(吉)2017-0001,动物质量合格证号为 2018112304。在环境温度(23 ± 2)℃,相对湿度 60%~70%,光照 12 h 明暗交替环境中适应性喂养 1 周后进行试验。

1.2 方法

模型制备及分组、给药:将 60 只大鼠分为假手术组(等体积生理盐水),模型组(等体积生理盐水),NBP 低、中、高剂量组(10, 20, 40 mg/kg),各 12 只。采用改良 Feeney 自由落体撞击法制备大鼠 TBI 模型。麻醉后将大鼠俯卧固定在立体定位仪上,备皮消毒后切开头部皮肤,于冠状缝中线右侧开 3 cm 磨取 5 mm 的骨窗,用颅脑撞击器在硬脑膜上放置 1 个与骨孔大小吻合的垫片及直径 4 mm 的撞针,用 40 g 砝码从 40 cm 高处自由落体撞击撞针,造成大鼠右侧大脑半球脑挫裂伤。假手术组只磨取骨窗,不予撞击。缝合切口,待大鼠麻醉清醒后,各组大鼠分别腹腔注射相应药物(注射体积每 100 g 体质量 2 mL),每日 1 次,连续 7 d^[9]。

神经功能缺损评分:末次给药 1 h 后评估神经功能,完全无法走路计 5 分,无法自发行走和失去知觉计 4 分,走路时向内倾斜计 3 分,走路时向内旋转计 2 分,前爪无法完全伸展计 1 分,无神经功能障碍表现计 0 分。

脑组织含水量检测:处死大鼠,取脑组织,去除软脑膜和凝血块,每组 4 只以福尔马林固定,4 只以液氮保存,4 只进行脑含水量测定。取右侧脑半球,称定体质量后置 60℃烤箱中烤至恒重,再次称定质量,计算脑组织含水量。含水量 = (湿质量 - 干质量) / 湿质量 $\times$ 100%。

脑细胞凋亡检测:制备常规脑组织病理石蜡切片,经二甲苯脱蜡和无水乙醇脱水后,以 TUNEL 法采用荧光显微镜检测凋亡细胞,以碘化丙啶(DAPI)反染细胞核,计算阳性细胞率。

MDA 和 SOD 水平检测:制备脑组织匀浆,吸取上清液,按酶联免疫吸附法测定 MDA 和 SOD 水平。

RACK1, p-IRE1, XBP1, GRP78 表达水平检测:采用 western blot 法。制备脑组织匀浆,取 50 mg,加入 1 mL 预冷蛋白抽提试剂,冰浴 2 h,离心,取上清液,100℃煮 10 min 进行变性。各组取 20 μ g 上样,转膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入 RACK1(1:400)、p-IRE1(1:200)、XBP1(1:200)、GRP78(1:300)一抗,4℃孵育过夜,回收一抗,TBST 清洗 2 次,加入二抗(1:5 000),在室温下孵育 30 min,回收二抗,TBST 清洗 3 次,加入 ECL 化学发光试剂,将 PVDF 膜放入暗盒中,压上 X 胶片,取出胶片后显影、定影、清洗。然后,通过 Image J 软件将条带灰度值数字化,目的条带与内参条带灰度比值为各目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计学软件分析。定量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对神经功能缺损评分和脑组织含水量的影响

与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分和脑组织含水量显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,NBP 低、中、低剂量组大鼠神经功能缺损评分和脑组织含水量显著降低,且呈剂量依赖性($P < 0.05$)。详见表 1。

2.2 对脑细胞凋亡的影响

与假手术组大鼠细胞凋亡指数[(0.48 ± 0.17)%]
比较,模型组大鼠[(6.30 ± 0.52)%]
显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,NBP 低、中、高剂量组大鼠凋亡指数[(3.62 ± 0.48)%, (2.51 ± 0.37)%, (1.10 ± 0.27)%]
均显著降低,且呈剂量依赖关系($P < 0.05$)。详见图 1。

2.3 对脑组织匀浆中 MDA 和 SOD 水平的影响

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织匀浆中 MDA 水平显著升高,SOD 水平显著降低($P < 0.05$);与模型

表 1 各组大鼠神经功能缺损评分和脑组织含水量比较($\bar{X} \pm s, n=4$)
Tab.1 Comparison of neurological deficit score and brain water content of rats in each group($\bar{X} \pm s, n=4$)

组别	剂量(mg/kg)	神经功能缺损评分(分)	脑组织含水量(%)
假手术组		0	77.54 ± 0.28
模型组		3.40 ± 0.28 ^a	82.23 ± 0.49 ^a
NBP 低剂量组	10	2.84 ± 0.36 ^b	80.68 ± 0.51 ^b
NBP 中剂量组	20	1.88 ± 0.27 ^{bc}	79.25 ± 0.35 ^{bc}
NBP 高剂量组	40	1.15 ± 0.12 ^{bed}	78.91 ± 0.41 ^{bed}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与 NBP 低剂量组比较,^c $P < 0.05$;与 NBP 中剂量组比较,^d $P < 0.05$ 。表 2、表 3 同。

Note: Compared with those in the sham operation group, ^a $P < 0.05$; compared with those in the model group, ^b $P < 0.05$; compared with those in the NBP low-dose group, ^c $P < 0.05$; compared with those in the NBP medium-dose group, ^d $P < 0.05$; as well as Tab. 2 and Tab. 3.

组比较, NBP 低、中、高剂量组大鼠脑组织匀浆中 MDA 水平显著降低, SOD 水平显著升高, 且呈剂量依赖关系 ($P < 0.05$)。详见表 2。

2.4 对脑组织匀浆中 RACK1, p-IRE1, XBP1, GRP78 表达水平的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织匀浆中 RACK1 水平显著降低, p-IRE1, XBP1, GRP78 水平均显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, NBP 低、中、高剂量组大鼠脑组织匀浆中 RACK1 水平显著升高, p-IRE1, XBP1, GRP78 水平均显著降低, 且呈剂量依赖关系 ($P < 0.05$)。详见表 3 及图 2。

3 讨论

TBI 24 h 后, 外伤皮质周围氧化产物(MDA)水平升高, 抗氧化酶活性减弱^[10]。本研究中, NBP 可减轻 TBI

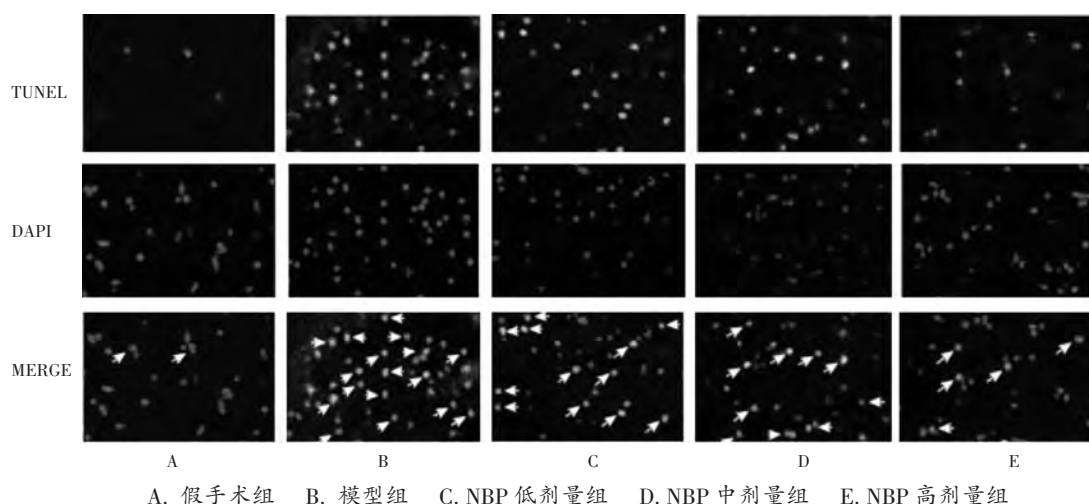


图 1 大鼠脑细胞凋亡情况

A. Sham operation group B. Model group C. NBP low-dose group D. NBP medium-dose group E. NBP high-dose group

Fig.1 Apoptosis of brain cells of rats

表 2 各组大鼠脑组织匀浆中 MDA 和 SOD 水平比较
($\bar{X} \pm s, n=4$)

Tab.2 Comparison of MDA and SOD levels in brain homogenate of rats in each group($\bar{X} \pm s, n=4$)

组别	剂量(mg/kg)	MDA(nmol/mg)	SOD(U/g)
假手术组		4.78 ± 0.57	24.35 ± 3.42
模型组		12.09 ± 1.82 ^a	7.34 ± 0.40 ^a
NBP 低剂量组	10	9.52 ± 0.43 ^b	9.75 ± 0.98 ^b
NBP 中剂量组	20	7.68 ± 0.83 ^{bc}	13.84 ± 2.46 ^{bc}
NBP 高剂量组	40	6.02 ± 0.70 ^{bed}	17.28 ± 3.61 ^{bed}

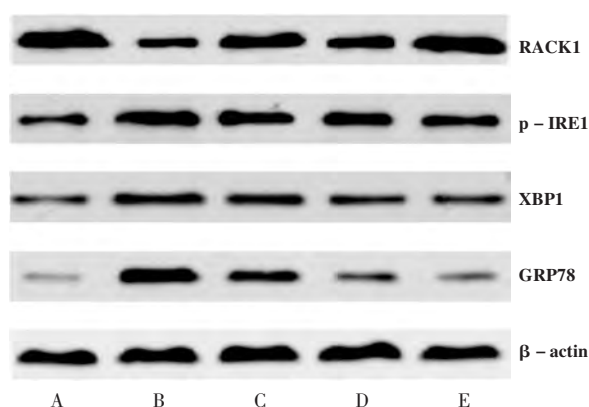
模型大鼠的氧化应激水平, 减轻脑水肿症状, 并改善神经功能评分, 抑制神经细胞凋亡。氧化应激在 TBI 病理过程中扮演重要作用。为了缓解氧化应激, 细胞激活 UPR 级联反应, 其目的是通过减少错误折叠蛋白的负荷来重建内质网蛋白稳定, 抑制细胞凋亡^[11]。最保守的

表 3 各组大鼠脑组织匀浆中 RACK1, p-IRE1, XBP1, GRP78 表达水平比较($\bar{X} \pm s, n=4$)

Tab.3 Comparison of RACK1, p-IRE1, XBP1 and GRP78 expression levels in brain homogenate of rats in each group($\bar{X} \pm s, n=4$)

组别	剂量(mg/kg)	RACK1	p-IRE1	XBP1	GRP78
假手术组		3.28 ± 0.41	0.42 ± 0.05	0.45 ± 0.07	0.19 ± 0.04
模型组		0.62 ± 0.07 ^a	1.82 ± 0.29 ^a	1.27 ± 0.28 ^a	1.76 ± 0.18 ^a
NBP 低剂量组	10	1.28 ± 0.25 ^b	1.53 ± 0.09 ^b	0.85 ± 0.14 ^b	1.27 ± 0.25 ^b
NBP 中剂量组	20	1.83 ± 0.37 ^{bc}	1.30 ± 0.21 ^{bc}	0.73 ± 0.09 ^{bc}	0.54 ± 0.04 ^{bc}
NBP 高剂量组	40	2.69 ± 0.13 ^{bed}	0.94 ± 0.08 ^{bed}	0.55 ± 0.06 ^{bed}	0.33 ± 0.05 ^{bed}

UPR 信号传导途径是由 IRE1 的激活引发的, IRE1 在增强细胞存活中起关键作用^[12]。RACK1 是 IRE1 信号传导的关键调节剂。敲除 RACK1 的阿尔茨海默病(AD)模型, 小鼠的大量神经细胞凋亡和神经功能损伤^[13]。本研究中 TBI 模型大鼠脑组织中 RACK1 水平降低, 与上述



A. 假手术组 B. 模型组 C. NBP 低剂量组
D. NBP 中剂量组 E. NBP 高剂量组

图2 大鼠脑组织匀浆中 RACK1, p-IRE1, XBP1, GRP78 表达水平

A. Sham operation group B. Model group C. NBP low-dose group
D. NBP medium-dose group E. NBP high-dose group

Fig. 2 Expression levels of RACK1, p-IRE1, XBP1 and GRP78 in brain homogenate of rats in each group

研究一致。相反, RACK1 过表达可显著改善脑外伤后的继发性脑损伤, NBP 可提高脑组织中 RACK1 水平^[14]。RACK1 的神经保护作用可能是通过激活 IRE1 磷酸化来实现的, 一旦被激活, IRE1 作为跨膜激酶催化去除编码 XBP1 的内含子, 产生剪接的 XBP1 mRNA, 产生功能性 XBP1 蛋白^[15]。IRE1 磷酸化导致了功能性转录因子 XBP1 及其下游靶基因 GRP78 的产生^[16]。RACK1 以葡萄糖刺激或氧化应激反应的方式与 IRE1 相互作用, 从而激活 IRE1。有研究使用 IRE1 抑制剂十二烷基苯磺酸 (DBSA) 进行论证性研究, 结果显示, DBSA 特异性降低 IRE1 磷酸化水平而抑制 IRE1 的激活^[17]。XBP1 充当转录因子, 结合细胞核中的应激元件启动子并促进 GRP78 表达, 以恢复蛋白质的正确构象, 并维持神经细胞稳态。研究表明, 磷酸化的 IRE1 和 XBP1 表达在试验性脑缺血和创伤后应激障碍模型动物中增加, 并促进神经细胞凋亡^[18]。本研究结果显示, NBP 抑制了 IRE1/XBP1 信号通路, 降低了脑组织中 GRP78 水平。

综上所述, NBP 对 TBI 模型大鼠神经功能有一定改善作用, 其机制与抑制 IRE1/XBP1 信号通路有关。

参考文献

- [1] KHELLAF A, KHAN DZ, HELMY A. Recent advances in traumatic brain injury[J]. J Neurol, 2019, 266(11):2878-2889.
- [2] 韦博, 李朝晖. 创伤性颅脑损伤患者脑能量代谢改变的特点与研究展望[J]. 第三军医大学学报, 2018, 40(13):1161-1165.
- [3] 朱军. 大鼠脑创伤后 RACK1 上调激活 IRE1-XBP1 通路实现神经保护的研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2018.
- [4] NI H, RUI Q, XU Y, et al. RACK1 upregulation induces neuroprotection by activating the IRE1-XBP1 signaling pathway following

- traumatic brain injury in rats[J]. Exp Neurol, 2018, 304:102-113.
- [5] TASHIRO E. Screening and identification of inhibitors of endoplasmic reticulum stress-induced activation of the IRE1 α -XBP1 branch[J]. J Antibiot, 2019, 72(12):899-905.
- [6] CASAS-TINTO S, ZHANG Y, SANCHEZ-GARCIA J, et al. The ER stress factor XBP1s prevents amyloid-beta neurotoxicity[J]. Hum Mol Genet, 2011, 21(11):2144-2160.
- [7] YAN C, LIU J, GAO J, et al. IRE1 promotes neurodegeneration through autophagy-dependent neuron death in the Drosophila model of Parkinson's disease[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(11):800.
- [8] 郭鹏. 左旋多巴苯酚对血管性痴呆大鼠神经功能、线粒体氧化应激及海马组织胶质细胞源性神经营养因子表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(6):1444-1447.
- [9] 王晓荣, 乌云高娃, 赵福全, 等. 丁基苯酚通过激活 PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路及其在局部脑缺血损伤脑梗死中的神经保护作用[J]. 实用医学杂志, 2019, 35(19):2998-3003.
- [10] LIU ZM, CHEN QX, CHEN ZB, et al. RIP3 deficiency protects against traumatic brain injury (TBI) through suppressing oxidative stress, inflammation and apoptosis: Dependent on AMPK pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 499(2):112-119.
- [11] ERFATH TBM, SEN D. DOR agonist (SNC-80) exhibits anti-parkinsonian effect via downregulating UPR/oxidative stress signals and inflammatory response in vivo[J]. Neurosci Lett, 2018, 678:29-36.
- [12] KOPP MC, LARBURU N, DURAIRAJ V, et al. UPR proteins IRE1 and PERK switch BiP from chaperone to ER stress sensor[J]. Nat Struct Mol Biol, 2019, 26(11):1053-1062.
- [13] AMIRI S, AZADMANESH K, DEGHAN SHASALTANEH M, et al. The Implication of Androgens in the Presence of Protein Kinase C to Repair Alzheimer's Disease-Induced Cognitive Dysfunction[J]. Iran Biomed J, 2020, 24(2):64-80.
- [14] HE W, TU M, DU Y, et al. Nicotine Promotes A β PP Nonamyloidogenic Processing via RACK1-Dependent Activation of PKC in SH-SY5Y-A β PP695 Cells[J]. J Alzheimer's Dis, 2020, 75(2):451-460.
- [15] LEE DY, HONG SH, KIM B, et al. Neuropeptide Y mitigates ER stress-induced neuronal cell death by activating the PI3K-XBP1 pathway[J]. Eur J Cell Biol, 2018, 97(5):339-348.
- [16] TSUCHIYA Y, SAITO M, KADOKURA H, et al. IRE1-XBP1 pathway regulates oxidative proinsulin folding in pancreatic β cells[J]. J Cell Biol, 2018, 217(4):1287-1301.
- [17] CHAURASIA M, GUPTA S, DAS A, et al. Radiation induces EIF2AK3/PERK and ERN1/IRE1 mediated pro-survival autophagy[J]. Autophagy, 2019, 15(8):1391-1406.
- [18] 肖飞, 张高峰, 尹曾, 等. 电针预处理对脑缺血再灌注大鼠皮层内质网 IRE1-XBP1 信号通路的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2018, 38(2):226-229.

(收稿日期: 2020-08-10)