

Nrf2介导的抗氧化途径对血管性痴呆大鼠认知损伤和海马神经元损伤的影响

魏芳 仝秀清 汪瑞霞

010059 呼和浩特, 内蒙古医科大学附属医院神经内科

通信作者: 汪瑞霞, Email: 1027369032@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2019.05.009

【摘要】目的 探讨Nrf2介导的抗氧化途径改善血管性痴呆大鼠的认知损伤和海马神经元损伤效果。**方法** 30只SPF级成年雄性SD血管性痴呆模型大鼠随机均分为3组: 模型组、实验1组与实验2组。模型组术后给予生理盐水5 μ l/d静脉注射, 实验1组与实验2组在造模后给予奥拉西坦10 ng/d、100 ng/d静脉注射, 连续2周。记录大鼠的认知损伤和海马神经元损伤情况, 并检测Nrf2表达与氧化指标变化。**结果** 3组造模后1 d的逃避潜伏期比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 实验组造模后7 d与14 d的逃避潜伏期都低于对照组($P < 0.05$), 实验组2组低于实验1组, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。造模后14 d实验组的NADPH氧化酶活性均低于对照组($P < 0.05$), 实验2组显著低于实验1组($P < 0.05$)。造模后14 d实验组的N-myc、Nrf2蛋白相对表达含量、海马神经元细胞活性与存活率都显著高于对照组($P < 0.05$), 实验2组显著高于实验1组($P < 0.05$)。**结论** 奥拉西坦可改善血管性痴呆大鼠的认知损伤和海马神经元损伤, 其机制可能与激活Nrf2介导的抗氧化途径及N-myc介导的神经元生长途径有关。

【关键词】 奥拉西坦; Nrf2; 痴呆, 血管性; 认知; 海马

基金项目: 内蒙古自治区卫生计生科研计划项目(201703097)

Effects of Nrf2-mediated antioxidant pathways on cognitive impairment and hippocampal neuronal injury in rats with vascular dementia

Wei Fang, Tong Xiuqing, Wang Ruixia

Department of Neurology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China

Corresponding author: Wang Ruixia, Email: 1027369032@qq.com

【Abstract】 Objectives To investigate the effects of Nrf2-mediated antioxidant pathways on cognitive impairment and hippocampal neuronal damage in rats with vascular dementia. **Methods** A total of 30 adult male SD rats of SPF grade were developed models of vascular dementia. They were randomly divided into three groups: the control group, experiment group 1 and experiment Group 2. The control group was given an intravenous injection of 5 μ l/d saline. experimental group 1 and experimental group 2 were given oxiracetam 10 ng/d and 100 ng/d intravenously for 2 weeks. The cognitive damage and hippocampal neuronal damage in rats were recorded, and the changes in Nrf2 expression and oxidative index were detected. **Results** There were no significant difference in escape latency across the three groups at 1 d after modeling ($P > 0.05$). The escape latency of the experimental groups at 7 d and 14 d after modeling was lower than that of the control group ($P < 0.05$); the the escape latency of experimental group 2 were lower than that of experimental group 1, but the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). The activity of NADPH oxidase in the experimental groups was lower than that in the control group ($P < 0.05$); the activity of NADPH in experimental group 2 were significantly lower than experimental group 1 ($P < 0.05$). The relative expression levels of N-myc and Nrf2 proteins and the activity and survival rates of hippocampal neurons in the experimental groups were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$); those indicators of experimental group 2 were significantly higher than experimental group 1 ($P < 0.05$). **Conclusions** Oxiracetam can ameliorate cognitive impairment and hippocampal neuronal damage in rats with vascular dementia, and its mechanism may be related to activation of Nrf2-mediated antioxidant pathways and N-myc-mediated neuronal growth pathway.

【Key words】 Oxiratan; Nrf2; Vascular dementia; Cognitive; Hippocampal

Fund program: Science and Technology Planning Project of Health and Family Planning of Inner Mongolia Autonomous Region (201703097)

血管性痴呆是由各种脑血管疾病因素引起脑组织受损、脑循环障碍,而导致的智能损害综合征,该病为一种慢性疾病,在临床上主要表现为认知功能障碍,严重威胁患者的身心健康^[1]。该病的致病基础为脑血管病,主要病因是患者脑灌注不足,促使氧自由基和脂质过氧化产物发生堆积,能够造成氧化应激损伤、神经元凋亡、细胞能量衰竭,最终导致疾病的发生^[2-3]。氧化应激(oxidative stress, OS)是由于机体内发生氧化与抗氧化失衡,从而引起细胞、组织的氧化损伤,其在血管性痴呆的发生与发展的每一个环节中都发挥重要作用^[4]。上调核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2 related factor 2, Nrf2)是一种抗氧化转录因子,可与抗氧化反应元件位点相结合,调节多种抗氧化应激蛋白基因和解毒酶基因的表达,减少活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的生成,抑制细胞内氧化应激损伤,从而发挥抗氧化应激的作用^[5-6]。奥拉西坦(olaxitan)是环羟基氨基丁酸的衍生物,可以有效改善血管性痴呆症状^[7];其可促进磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇的合成,增加神经细胞的蛋白质与核酸的形成作用,促进脑代谢,但是无法明确奥拉西坦是否通过抗氧化途径来改善血管性痴呆症状^[8]。由此本文旨在探讨奥拉西坦对血管性痴呆大鼠的认知损伤和海马神经元损伤的影响,并分析Nrf2介导的抗氧化途径在其中的调节作用。

一、材料与方法

1. 实验动物: SPF级成年雄性Sprague Dawley (SD)大鼠(30只)购自北京维通利华实验动物技术有限公司(动物许可证编号00010751, 4~5周龄,体重140~160 g,饲养环境:温度在22~24℃,相对湿度40%~60%,食水自由,12 h/12 h光照黑暗循环)。

2. 动物模型的建立与分组:所有大鼠都建立了血管性痴呆模型,禁食12 h后永久性结扎双侧颈总动脉,用10%的水合氯醛以700 mg/kg腹腔注射麻醉。固定大鼠,剪刀沿颈部正中剪开皮肤,钝性分离出右侧颈总动脉,结扎颈总动脉,将血管剪断,并逐层缝合。术后1周,采用相同方法结扎左侧颈总动脉。

建模后所有大鼠随机均分为3组:模型组、实验1组与实验2组。模型组术后给予生理盐水5 μl/d静脉注射,连续2周。实验1组在大鼠造模后即给予奥拉西坦(国药准字H20183388,青岛金峰制药有限公司)。10 ng/d尾静脉注射^[2],连续2周。实验2组大鼠造模后即给予奥拉西坦100 ng/d尾静脉注射,

连续2周。每次给药过程中,每只大鼠均更换经高压灭菌后导管帽及注射内针,预防感染。

3. 观察指标:(1)在造模后1 d、7 d与14 d进行水迷宫实验,记录逃避潜伏期。在水迷宫装置自动记录大鼠从入水到寻台成功的时间,即逃避潜伏期,如120 s大鼠仍未找到平台,则潜伏期为120 s。(2)在造模后14 d处死大鼠,迅速分离双侧的海马,迅即放入液氮中冷冻,于4℃下1 000 r/min离心15 min,取上清液,采用增强化学发光法检测海马区NADPH氧化酶的活性。(3)取海马组织的样本,提取总蛋白,采用Western blot法检测N-myc、Nrf2蛋白相对表达水平,以β-actin作为内标。(4)采用MTT法测定海马神经元的活力与存活率。解剖大鼠的大脑,分离出海马组织,剪成小块,采用胰酶消化20 min,用种植液终止消化,并用200目细胞过滤,常规培养,PBS每12小时清洗一次,持续3 d后进行后续实验。各组接种100 μl细胞悬液于96孔中,将MTT液10 μl添加到孔中,接着进行4 h的培养。选定酶联免疫检测仪上450 nm波长测定吸光度,对每组3个复孔的平均值进行计算。用以表示神经元活性;细胞存活率以正常细胞组吸光值均数为100%,细胞存活率(%)=各孔吸光度值/标准吸光度值均数×100%。

4. 统计学方法:应用软件SPSS 20.00分析数据,使用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)来描述计量数据,对比采用重复设计的多因素方差分析进行或者单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 3组逃避潜伏期对比:见表1。3组造模后1 d的逃避潜伏期比较差异无统计学意义($P > 0.05$),实验组造模后7 d与14 d均低于对照组(造模后7 d: $t=3.743$ 、6.966,均 $P < 0.01$;造模后14 d: $t=5.266$ 、7.908,均 $P < 0.01$),实验2组低于实验1组,但差异无统计学意义(造模后7 d: $t=1.464$, $P=0.166$;造模后14 d: $t=1.613$, $P=0.123$)。

2. 3组NADPH氧化酶活性对比:见表2。造模后14 d实验组的NADPH氧化酶活性都低于对照组($t=6.162$ 、11.208,均 $P < 0.001$),实验2组显著低于实验1组($t=4.048$, $P=0.002$)。

3. 3组N-myc、Nrf2表达对比:见表3。造模后14 d,实验组的N-myc蛋白相对表达含量都显著高于对照组($t=2.44$, $P=0.035$; $t=13.888$, $P < 0.001$),且实验2组显著高于实验1组($t=6.448$, $P < 0.001$);实验组的Nrf2蛋白相对表达含量都显著高于对照组($t=4.402$ 、11.604,均 $P < 0.001$),且实验2组显著高

于实验1组($t=8.719, P < 0.001$)。

4. 3组海马神经元细胞活性与存活率对比: 见表4。造模后14 d, 实验组的海马神经元细胞活性显著高于对照组($t=5.926、6.775$, 均 $P < 0.001$), 实验组2组也显著高于实验1组($t=3.375, P=0.005$); 实验组的存活率显著高于对照组($t=2.099, P=0.049$; $t=3.597, P=0.002$), 实验组2组也显著高于实验1组($t=2.170, P=0.043$)。

表1 3组大鼠造模后不同时间点的逃避潜伏期比较($s, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | 只数 | 1 d | 7 d | 14 d |
|------|----|---------------|----------------------------|----------------------------|
| 对照组 | 10 | 78.22 ± 12.48 | 67.22 ± 14.29 | 57.29 ± 11.42 |
| 实验1组 | 10 | 78.11 ± 13.72 | 38.77 ± 19.33 ^a | 28.76 ± 12.77 ^a |
| 实验2组 | 10 | 78.98 ± 11.47 | 28.67 ± 10.10 ^a | 20.76 ± 9.11 ^a |
| F值 | | 0.124 | 12.482 | 13.002 |
| P值 | | 0.967 | < 0.01 | < 0.01 |

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$

表2 3组大鼠造模后14 d的NADPH氧化酶活性比较(U/L, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 只数 | NADPH氧化酶活性 |
|------|----|---------------------------|
| 对照组 | 10 | 6.36 ± 1.44 |
| 实验1组 | 10 | 2.67 ± 1.23 ^a |
| 实验2组 | 10 | 0.98 ± 0.48 ^{ab} |
| F值 | | 12.747 |
| P值 | | < 0.001 |

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与实验1组比较, ^b $P < 0.05$

表3 3组大鼠造模后14 d的N-myc、Nrf2表达比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 只数 | N-myc | Nrf2 |
|------|----|---------------------------|---------------------------|
| 对照组 | 10 | 0.87 ± 0.33 | 1.37 ± 1.42 |
| 实验1组 | 10 | 2.01 ± 1.44 ^a | 3.82 ± 1.04 ^a |
| 实验2组 | 10 | 5.62 ± 1.03 ^{ab} | 8.24 ± 1.22 ^{ab} |
| F值 | | 9.422 | 7.584 |
| P值 | | 0.001 | 0.009 |

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与实验1组比较, ^b $P < 0.05$

表4 3组大鼠造模后14 d的海马神经元细胞活性与存活率比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 只数 | 吸光度 | 存活率(%) |
|------|----|---------------------------|----------------------------|
| 对照组 | 10 | 0.32 ± 0.10 | 50.02 ± 8.22 |
| 实验1组 | 10 | 0.56 ± 0.08 ^a | 56.29 ± 4.65 ^a |
| 实验2组 | 10 | 0.78 ± 0.19 ^{ab} | 61.03 ± 5.11 ^{ab} |
| F值 | | 8.221 | 6.583 |
| P值 | | 0.004 | 0.013 |

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与实验1组比较, ^b $P < 0.05$

讨论 血管性痴呆的致病基础为脑血管病, 功能缺损主要体现在认知、记忆力等方面, 能够造成

患者认知障碍及获得性功能减退。该病是中老年人群的常见病、多发病, 同时也给患者家庭和社会带来越来越沉重的负担。现代研究表明血管性痴呆最普遍的病理学机制为脑缺血造成损害, 由于存在脑缺血导致大脑出现缺氧^[9-10]。该病目前尚无有效的药物与疗法, 但在疾病早期给予治疗可显著减轻患者临床症状。

奥拉西坦能促进磷脂胆碱和磷脂乙醇胺合成, 对特异性的中枢神经通路有介导作用, 稳定神经细胞膜结构和机能, 促进大脑皮质联络纤维突触的可塑性^[11]。本研究显示3组造模后1 d的逃避潜伏期比较差异无统计学意义, 实验组造模后7 d与14 d的逃避潜伏期都低于对照组, 实验2组低于实验1组; 造模后14 d实验组的海马神经元细胞活性与存活率显著高于对照组, 实验2组也显著高于实验1组, 表明奥拉西坦能改善血管性痴呆大鼠的认知损伤和海马神经元损伤。

氧化应激损伤是机体受到有害刺激时体内氧化系统和抗氧化系统失衡, 从而引起组织不可逆的损伤。在正常生理状态下, ROS浓度较低, 活化转录因子、诱导细胞凋亡, 从而参与介导多种生理活动。当脑组织缺氧时, 可造成ROS堆积, 生成的过氧化脂质进一步降解后形成对神经元具有毒性的醛类, 从而对脑组织产生进一步损伤; 同时ROS可使蛋白质发生变性, 从而导致酶失活, 造成细胞功能受阻^[12]。本研究显示造模后14 d实验组的NADPH氧化酶活性均低于对照组, 实验2组显著低于实验1组, NADPH氧化酶是氧化应激的主要来源, 因此这些数据表明奥拉西坦可降低血管性痴呆大鼠海马的氧化应激损伤, 降低ROS增加。奥拉西坦具有抗氧化作用, 能够有效抑制慢性脑低灌注损伤导致的海马神经元凋亡的发生。相关研究也表明奥拉西坦还可以增加小鼠海马部位K⁺介导的乙酰胆碱的释放, 提升小鼠对空间的认知能力; 其也可以增加大鼠的下丘脑神经元钠钾电流, 进而改善脑功能^[13]。

海马是人体记忆功能的活动中枢, 对于脑组织的缺氧、缺血等损伤极为敏感。过量活性氧可引起线粒体脱氧核糖核酸和呼吸链损伤, 引发ROS的进一步生成, 引发脑组织内的微循环异常, 导致神经毒性损伤。Nrf2为抗氧化转录因子, 具有神经保护作用, 可通过Keap1-Nrf2-ARE通路或者AMPK-Nrf2通路发挥抗氧化作用^[14]。N-myc是一个原癌基因, 也是一个生长调节基因, 在对多种组织器官的生长发育有重要的调节作用^[15]。本研究显示造模后14 d

实验组的N-myc、Nrf2蛋白相对表达含量都显著高于对照组,实验2组显著高于实验1组,这些结果表明,一方面奥拉西坦可通过增加Nrf2的表达,促进抗氧化作用,缓解脑缺氧导致的氧化损伤。另一方面,奥拉西坦增加N-myc的表达,促进神经元的再生,产生神经保护作用。本研究也有一定的不足,Nrf2介导的抗氧化途径比较多,本研究只分析了单一途径,且本研究没有设置空白对照,可能存在研究偏倚,将在后续研究中深入分析。

总之,奥拉西坦可改善血管性痴呆大鼠的认知损伤和海马神经元损伤,其机制可能与激活Nrf2介导的抗氧化途径及N-myc介导的神经元生长途径有关。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 本研究试验构思及设计为魏芳、汪瑞霞,实验操作、数据分析及表格绘制为魏芳、全秀清、汪瑞霞,论文撰写为魏芳,论文修订为汪瑞霞

参 考 文 献

- [1] 雷鸣,张玉洁,李银萍,等.微流控芯片上的神经损伤模型的建立及相关药物的保护作用[J].武汉大学学报(医学版),2018,39(4):610-614. DOI: 10.14188/j.1671-8852.2018.0047.
- Lei M, Zhang YJ, Li YP, et al. Construction of Neuron Injury Model and Research of Relevant Neuronal Protective Drugs on Microfluidic Chips[J]. Medical Journal of Wuhan University, 2018, 39(4): 610-614.
- [2] Impellizzeri D, Siracusa R, Corlaro M, et al. N-Palmitoylethanolamine-oxazoline (PEA-OXA): A new therapeutic strategy to reduce neuroinflammation, oxidative stress associated to vascular dementia in an experimental model of repeated bilateral common carotid arteries occlusion[J]. Neurobiol Dis, 2019, 125: 77-91. DOI: 10.1016/j.nbd.2019.01.007.
- [3] 贾耀丽.鼠神经生长因子与奥拉西坦注射液治疗新生儿缺氧缺血性脑病的疗效对比[J].中国实用神经疾病杂志,2016,19(11):131. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5110.2016.11.084.
- [4] Jiang P, Chen L, Sun J, et al. Chotosan ameliorates cognitive impairment and hippocampus neuronal loss in experimental vascular dementia via activating the Nrf2-mediated antioxidant pathway[J]. J Pharmacol Sci, 2019, 139(2): 105-111. DOI: 10.1016/j.jphs.2018.12.003.
- [5] Kaufman MJ, Kanayama G, Hudson JI, et al. Supraphysiologic-dose anabolic-androgenic steroid use: A risk factor for dementia[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2019, 100: 180-207. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2019.02.014.
- [6] 曹岩菁,吴佳丽,李鹏,等.血管性痴呆大鼠海马中神经递质囊泡转运体的表达[J].温州医科大学学报,2018,48(11):801-806,812. DOI: CNKI: SUN: WZYX.0.2018-11-007.
- Cao YQ, Wu JL, Li P, et al. The expression analysis of transmitter related vesicle transporters of hippocampal in CCI induced-vascular dementia rats[J]. Journal of Wenzhou Medical University, 2018, 48(11): 801-806, 812.
- [7] Kerr F, Bjedov I, Sofola-Adesakin O. Molecular Mechanisms of Lithium Action: Switching the Light on Multiple Targets for Dementia Using Animal Models[J]. Front Mol Neurosci, 2018, 11: 297. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00297.
- [8] Lee JA, Kim HR, Kim J, et al. The Novel Neuroprotective Compound KMS99220 Has an Early Anti-neuroinflammatory Effect via AMPK and HO-1, Independent of Nrf2 [J]. Exp Neurobiol, 2018, 27(5): 408-418. DOI: 10.5607/en.2018.27.5.408.
- [9] 胡艳芹,卜晓刚,高玲霞,等.注射用奥拉西坦联合鼠神经因子治疗急性脑出血临床疗效及对患者血清炎症因子的影响[J].空军医学杂志,2018,34(5):344-347. DOI: CNKI: SUN: ZJZY.0.2018-05-020.
- Hu YQ, Bu XG, Gao LX, et al. Clinical effect of oxiracetam combined with rat nerve factor on acute cerebral hemorrhage and its effect on serum inflammatory cytokines[J]. Medical Journal of Air Force, 2018, 34(5): 344-347.
- [10] Morroni F, Sita G, Graziosi A, et al. Neuroprotective Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester in A Mouse Model of Alzheimer's Disease Involves Nrf2/HO-1 Pathway[J]. Aging Dis, 2018, 9(4): 605-622. DOI: 10.14336/AD.2017.0903.
- [11] Rojo AI, Pajares M, García-Yagüe AJ, et al. Deficiency in the transcription factor NRF2 worsens inflammatory parameters in a mouse model with combined tauopathy and amyloidopathy[J]. Redox Biol, 2018, 18: 173-180. DOI: 10.1016/j.redox.2018.07.006.
- [12] Sathyamoorthy Y, Kaliappan K, Nambi P, et al. Glycyrrhizic acid renders robust neuroprotection in rodent model of vascular dementia by controlling oxidative stress and curtailing cytochrome-c release[J]. Nutr Neurosci, 2019, 22: 1-16. DOI: 10.1080/1028415X.2019.1580935.
- [13] 于云秀.奥拉西坦联合鼠神经生长因子治疗脑卒中的疗效观察[J].中国实用神经疾病杂志,2016,19(20):17-19. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5110.2016.20.009.
- Yu YX. Observation on the curative effects of oxiracetam combined with mouse nerve growth factor in the treatment of stroke[J]. Chinese Journal of Practical Nervous Diseases, 2016, 19(20): 17-19.
- [14] 石喆,陈晓辉,徐恩.核因子E2相关因子2在脑缺血再灌注中的作用及其机制[J].国际脑血管病杂志,2017,25(10):938-944. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4165.2017.10.012.
- Shi Z, Chen XH, Xu E. The roles and mechanisms of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 in cerebral ischemia-reperfusion[J]. International Journal of Cerebrovascular Diseases, 2017, 25(10): 938-944.
- [15] Maya-Mendoza A, Ostrakova J, Kosar M, et al. Myc and Ras oncogenes engage different energy metabolism programs and evoke distinct patterns of oxidative and DNA replication stress[J]. Mol Oncol, 2015, 9(3): 601-616. DOI: 10.1016/j.molonc.2014.11.001.

(收稿日期:2019-04-04)

(本文编辑:戚红丹)