

穿心莲内酯通过 Nrf2/HO - 1 通路对脑出血大鼠血 - 脑脊液屏障的保护作用

姜燕强 段国华 陈利平 李世岩 赵华伟 刘亚利 刘 英

摘要 **目的** 探讨穿心莲内酯(andrographolide, AND)对脑出血大鼠血 - 脑脊液屏障(blood - brain barrier, BBB)的保护作用及机制。**方法** 采用自体血注射法制备脑出血大鼠模型,分别 1 次/天灌胃给予 0.9% 氯化钠溶液(模型组)、尼莫地平(NMP) 10mg/kg 或 AND 低、中、高剂量(25、50、100mg/kg)进行治疗,疗程 7 天;另设假手术组。根据 mNSS 行神经功能缺失评分;测定脑血肿体积、脑含水量和 BBB 通透性;分光光度法检测氧化应激指标,ELISA 法检测炎性细胞因子水平,Western blot 法检测 Claudin - 5、Occludin、ZO - 1、Nrf2、血红素加氧酶 - 1(heme oxygenase - 1, HO - 1)、核因子(nuclear factor, NF) - κ B、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)9 表达。**结果** 与假手术组比较,模型组神经功能缺失评分、脑血肿体积、含水量、BBB 通透性升高($P < 0.01$);丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量和白细胞介素(interleukin, IL) - 1 β 、IL - 6、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF) - α 水平升高,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性降低($P < 0.01$);Claudin - 5、Occludin、ZO - 1、Nrf2、HO - 1 表达量降低而 NF - κ B、MMP9 表达量升高($P < 0.01$)。与模型组比较,AND 中、高剂量组和 NMP 组神经功能缺失评分、脑血肿体积、含水量、BBB 通透性降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);MDA 含量和 IL - 1 β 、IL - 6、TNF - α 水平降低, SOD、CAT 活性升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);Claudin - 5、Occludin、ZO - 1、Nrf2、HO - 1 表达量升高且 NF - κ B、MMP9 表达量降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);AND 高剂量组效果优于 NMP 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** AND 对脑出血大鼠 BBB 结构和通透性具有保护作用,可能与激活 Nrf2/HO - 1 通路,抑制氧化应激和炎症反应、下调 MMP9 表达有关。

关键词 穿心莲内酯 脑出血 血 - 脑脊液屏障 氧化应激 Nrf2/HO - 1 通路

中图分类号 R285.5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2023.07.019

Protective Effect of Andrographolide on the Blood - brain Barrier of Rats with Cerebral Hemorrhage through Nrf2/HO - 1 Pathway.

JIANG Yanqiang, DUAN Guohua, CHEN Liping, et al. Wuan First People's Hospital, Hebei 056300, China

Abstract Objective To investigate the protective effect and mechanism of andrographolide (AND) on the blood - brain barrier (BBB) of rats with cerebral hemorrhage. **Methods** The model rats with cerebral hemorrhage were made by autogenous blood injection, which were treated with normal saline (model group), nimodipine (NMP) 10mg/kg or AND low, medium, high dose (25, 50, 100mg/kg) by gavage once daily for 7d; and the sham group was set up. The neurological deficit was scored according to mNSS; the cerebral hematoma volume, brain water content and BBB permeability were detected; the oxidative stress index of brain tissue was detected by spectrophotometry, the level of inflammatory factors was detected by ELISA, the expression of Claudin - 5, Occludin, ZO - 1, Nrf2, HO - 1, NF - κ B, MMP9 were detected by Western blot. **Results** Compared with the sham group, the neurological deficit score, cerebral hematoma volume, brain water content, BBB permeability in model group were increased ($P < 0.01$); the MDA content and IL - 1 β , IL - 6, TNF - α level were increased, the SOD, CAT activity were decreased ($P < 0.01$); the expression of Claudin - 5, Occludin, ZO - 1, Nrf2, HO - 1 were decreased and the NF - κ B, MMP9 were increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the neurological deficit score, cerebral hematoma volume, brain water content, BBB permeability in AND medium, high dose group and NMP group were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the MDA content and IL - 1 β , IL - 6, TNF - α level were decreased, the SOD, CAT activity were increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the expression of Claudin - 5, Occludin, ZO - 1, Nrf2, HO - 1 were increased and the NF - κ B, MMP9 were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the effect of AND high dose group was better than NMP group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** AND has protective effect on structure and permeability of BBB in rats with cerebral hemorrhage; which may be related to the activation of Nrf2/HO - 1 pathway, inhibition of oxidative stress and inflammation, down - regulation of MMP9 expression.

Key words Andrographolide; Cerebral hemorrhage; BBB; Oxidative stress; Nrf2/HO - 1 pathway

基金项目:河北省医学科学研究课题项目(20201590)

作者单位:056300 邯郸,武安市第一人民医院

通信作者:姜燕强,电子邮箱:xtrmyywxg@163.com

脑出血约占脑卒中患者的30%,具有起病急、进展快、致死率和致残率高的特点。血肿占位、颅内压升高等将导致脑出血后炎症、氧化应激损伤,破坏血-脑脊液屏障(blood-brain barrier, BBB)而引发血管源性脑水肿,是导致脑出血患者死亡和残疾的重要原因^[1-3]。核因子E2相关因子2/血红素加氧酶1(nuclear factor E2 related factor 2/heme oxygenase 1, Nrf2/HO-1)通路参与机体炎症和氧化应激反应的调控^[4]。穿心莲内酯(andrographolide, AND)是提取自穿心莲的一种倍半萜类化合物,有研究发现AND通过激活Nrf2/HO-1通路抑制氧化应激和炎症反应对缺血性心肌细胞和肝细胞损伤起到保护作用^[5,6]。本研究旨在探讨AND对脑出血大鼠BBB及Nrf2/HO-1通路的影响,现将研究结果报道如下。

材料与方 法

1. 材料:(1)动物:240只清洁级SD大鼠(雄性、7周龄,220~240g)购自河北省实验动物中心[SCXK(冀)2018-004]。分笼饲养1周后进行实验,饲养环境:25℃、相对湿度60%~70%、光照黑暗各12h交替。本实验经武安市第一人民医院医学伦理学委员会审核批准(伦理学审批号:WASY-YY-KY-2020-013)。(2)药品与试剂:AND胶囊购自惠州市九惠制药股份有限公司;尼莫地平(nimodipine, NMP)胶囊购自海南普利制药股份有限公司;伊文思蓝购自国药集团化学试剂有限公司;白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 试剂盒和丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)试剂盒购自北京索莱宝生物科技有限公司;Claudin-5、Occludin、ZO-1、Nrf2、血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)、核因子(nuclear factor, NF)- κ B、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)9、 β -actin抗体和IgG二抗购自北京博奥森生物技术有限公司。

2. 分组、模型制备与给药:240只大鼠随机取40只作为假手术组,剩余200只参照文献^[7]报道的自体血注射法制备脑出血大鼠模型:禁食、禁水12h后实施麻醉,经左侧股动脉取血后俯卧位固定于脑立体定位仪,沿正中切开头皮和骨膜,暴露前囟,在中线右旁3.5mm与前囟前0.2mm交汇处钻孔,通过微量注射器在脑基底节区(深度6mm)10 μ l/min注射50 μ l自身股动脉血,无菌骨蜡封闭钻孔、缝合皮肤;造模完成后,随机分为模型组、NMP组和AND低、中、高剂

组,每组40只。给药:NMP组1次/天灌胃给予浓度2mg/ml的NMP溶液5ml/kg,AND低、中、高剂量组分别1次/天灌胃给予浓度5、10、20mg/ml的AND溶液5ml/kg(根据人和大鼠药物剂量换算公式,分别为1/2倍、1倍、2倍人临床剂量),假手术组和模型组1次/天灌胃给予0.9%氯化钠溶液5ml/kg,疗程7天^[8]。

3. 神经功能缺失评分和脑血肿体积检测:各组随机取8只大鼠,根据mNSS进行神经功能缺失评分。麻醉后,颈椎脱臼处死、断头、取脑组织,4%多聚甲醛溶液固定72h,通过高速冷冻切片机、以注射给药针孔为中心连续切片(厚度0.5mm),检测血肿最大层面互为垂直的最大横径和最大纵径长度,然后根据多田公式计算脑血肿体积,血肿体积=($\pi/6$) \times 最大横径(mm)最大纵径(mm) \times 血肿层数 \times 切片厚度(mm)。

4. 脑含水量的测定:各组随机另取8只大鼠,麻醉后颈椎脱臼处死、断头、取脑组织,0.9%氯化钠溶液冲洗并拭干,去除小脑和脑干后称重为湿重($W_{湿}$),100℃烘干至恒重后称量为干重($W_{干}$),脑含水量(%)=($W_{湿}-W_{干}$)/ $W_{湿}$ \times 100%

5. BBB通透性测定:各组随机另取8只大鼠,尾静脉注射2%的伊文思蓝溶液4ml/kg,1h后实施麻醉,开胸暴露心脏,由左心室-右心耳通路灌注300ml 0.9%氯化钠溶液,断头、取脑组织,取右侧半脑、研磨匀浆后加入3倍量甲酰胺溶液(浓度50%),60℃孵育24h后3000r/min离心10min取上清液,按照试剂盒说明检测伊文思蓝含量,伊文思蓝含量可反映BBB通透性。

6. 脑组织MDA含量、SOD、CAT活性和IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平检测:取各组剩余的8只大鼠,麻醉后颈椎脱臼处死、断头、在冰上剥取脑组织,取右脑注射针孔周围脑组织,剪碎后加入4℃RIPA裂解液在冰上静置30min使其充分裂解,3500r/min离心10min取上清液,按照试剂盒说明,通过分光光度计检测MDA含量和SOD、CAT活性;通过酶标仪检测IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平。

7. 蛋白免疫印迹法检测脑组织Claudin-5、Occludin、ZO-1、Nrf2、HO-1、NF- κ B、MMP9表达:取脑组织裂解液,4℃、12000r/min离心15min取上清液,BCA法测定蛋白浓度,分别取30 μ g蛋白行SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白,转膜、封闭处理后滴加目标蛋白、 β -actin抗体后4℃孵育过夜,洗膜后滴加IgG室温孵育1.5h,通过ECL显色,以目标蛋白与 β -actin条带灰度值的比值做为目标蛋白相对表达量。

8. 统计学方法:应用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计分析,符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *LSD-t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组大鼠神经功能缺失评分、脑水肿体积、脑

含水量、BBB 通透性比较:与假手术组比较,模型组神经功能缺失评分、脑含水量、伊文思蓝含量升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,AND 中、高剂量组和 NMP 组神经功能缺失评分、脑水肿体积、脑含水量、伊文思蓝含量降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与 NMP 组比较,AND 高剂量组神经功能缺失评分、脑水肿体积、伊文思蓝含量降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图 1)。

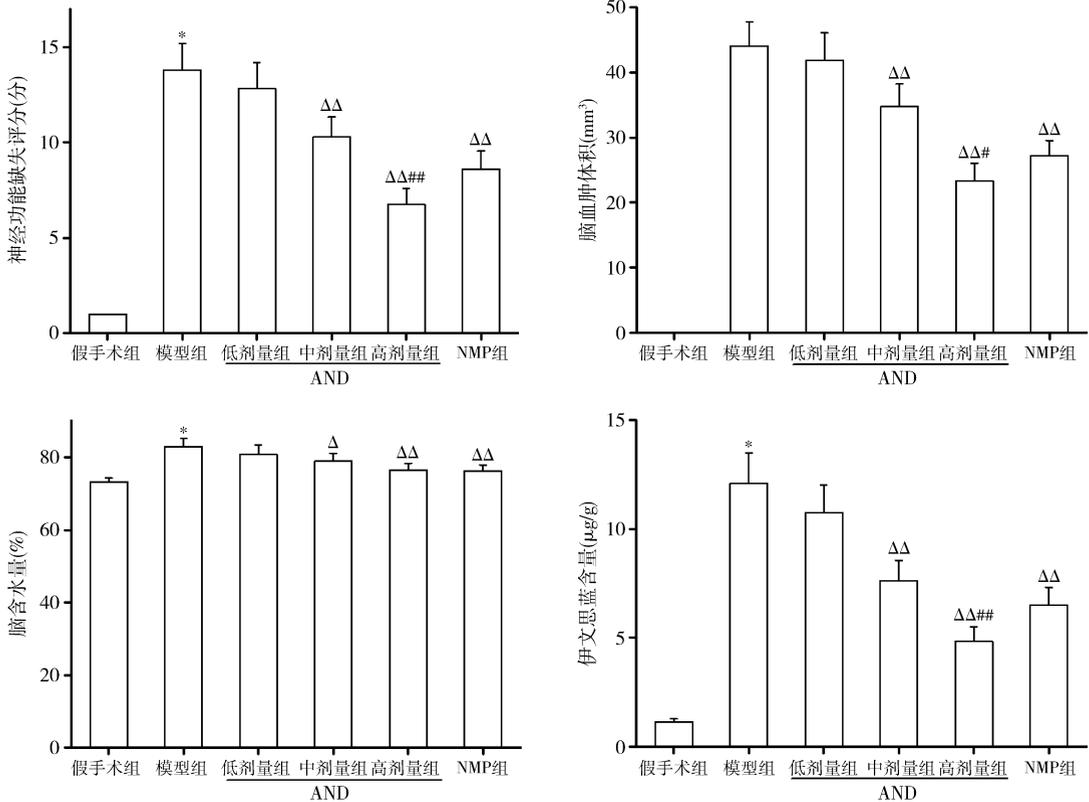


图 1 各组大鼠神经功能缺失评分、脑水肿体积、脑含水量、伊文思蓝含量比较 ($n = 8$)

与假手术组比较, * $P < 0.01$;与 NMP 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2. 各组大鼠脑组织 MDA 含量和 SOD、CAT 活性比较:与假手术组比较,模型组 MDA 含量升高,SOD、CAT 活性降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,AND 中、高

剂量组和 NMP 组 MDA 含量降低,SOD、CAT 活性升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与 NMP 组比较,AND 高剂量组 MDA 含量降低,SOD、CAT 活性升高 ($P < 0.05$,图 2)。

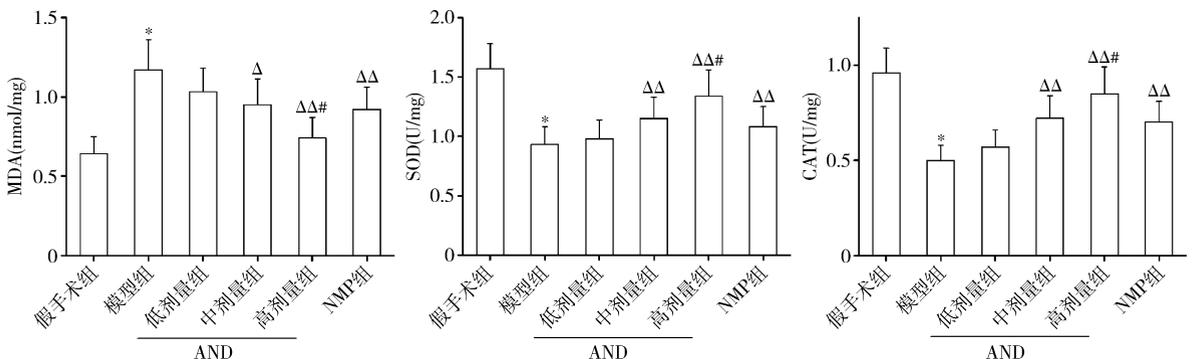


图 2 各组大鼠脑组织 MDA 含量和 SOD、CAT 活性比较 ($n = 8$)

与假手术组比较, * $P < 0.01$;与 NMP 组比较, # $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

3. 各组大鼠脑组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量比较:与假手术组比较,模型组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量升高($P < 0.01$);与模型组比较,AND 中、高剂量

量组和 NMP 组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与 NMP 组比较,AND 高剂量组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量降低($P < 0.05$,图 3)。

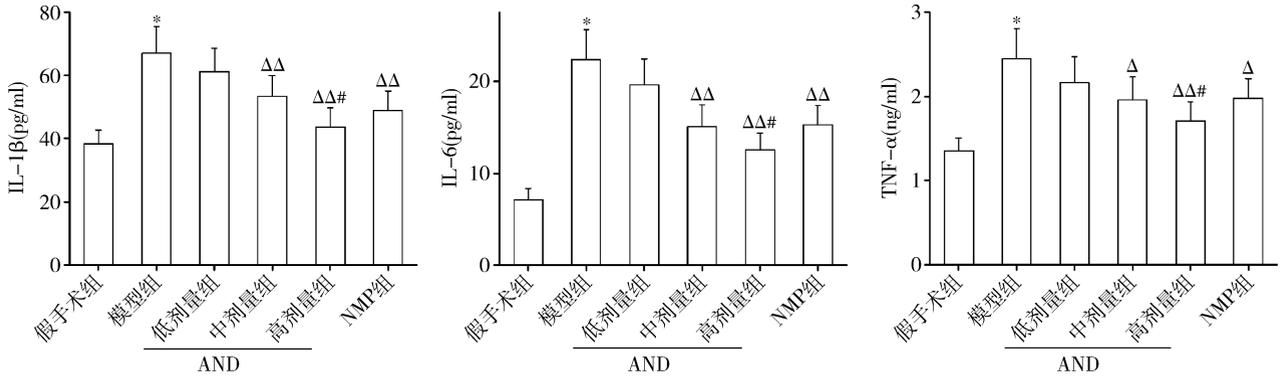


图 3 各组大鼠脑组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量的比较($n = 8$)

与假手术组比较,* $P < 0.01$;与 NMP 组比较,# $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

4. 各组大鼠脑组织 Claudin-5、Occludin、ZO-1 表达比较:与假手术组比较,模型组 Claudin-5、Occludin、ZO-1 表达量降低($P < 0.01$);与模型组比较,AND 中、高剂量组和 NMP 组 Claudin-5、Occludin、ZO-1 表达量升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与 NMP 组比较,AND 高剂量组 Claudin-5、Occludin、ZO-1 表达量升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图 4、图 5)。

5. 各组大鼠脑组织 Nrf2、HO-1、NF- κ B、MMP9 表达比较:与假手术组比较,模型组 Nrf2、HO-1 表达量降低,NF- κ B、MMP9 表达量升高($P < 0.01$);与模型组比较,AND 中、高剂量组和 NMP 组 Nrf2、HO-1 表达量升高,NF- κ B、MMP9 表达量降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与 NMP 组比较,Nrf2、HO-1 表达量升高,NF- κ B、MMP9 表达量降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图 6、图 7)。

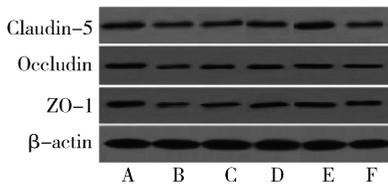


图 4 各组大鼠脑组织 Claudin-5、Occludin、ZO-1 表达

A. 假手术组;B. 模型组;C. AND 低剂量组;D. AND 中剂量组;E. AND 高剂量组;F. NMP 组

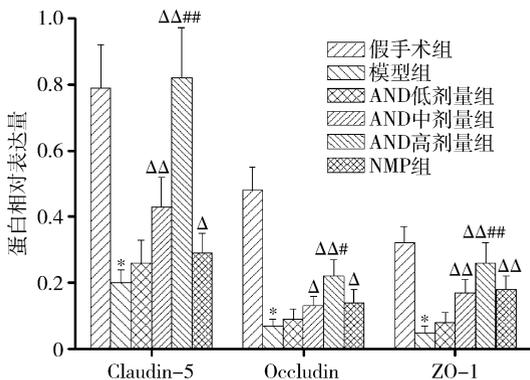


图 5 各组大鼠脑组织 Claudin-5、Occludin、ZO-1 表达量比较($n = 8$)

与假手术组比较,* $P < 0.01$;与 NMP 组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

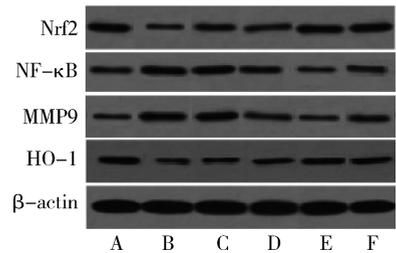


图 6 各组大鼠脑组织 Nrf2、HO-1、NF- κ B、MMP9 表达

A. 假手术组;B. 模型组;C. AND 低剂量组;D. AND 中剂量组;E. AND 高剂量组;F. NMP 组

讨 论

Occludin 是构成 BBB 的细胞骨架蛋白,ZO-1 蛋白为胞质附着蛋白,Occludin 和 ZO-1 相互作用形成 TJPs 的基础结构,邱珂等^[9]研究发现,Occludin、ZO-1 缺失将导致 TJPs 结构受损。Claudin 家族蛋白是构成 BBB 的跨膜蛋白,有研究发现 Claudin-5 表达量与 BBB 通透性密切相关^[10, 11]。脑出血后颅内高压和脑疝占位等将病理性刺激小胶质细胞活化,释放活性氧(ROS)并分泌炎症细胞因子,导致脑组织

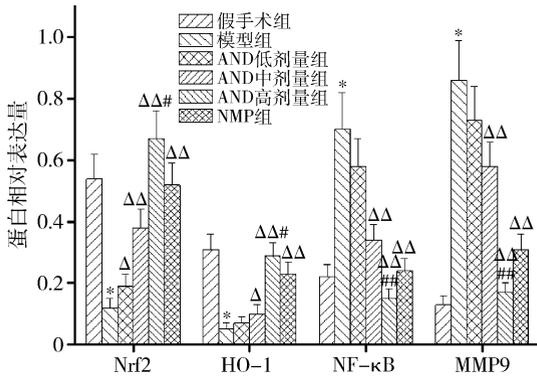


图7 各组大鼠脑组织 Nrf2、HO-1、NF-κB、MMP9 表达量比较 (n = 8)

与假手术组比较, * P < 0.01; 与 NMP 组比较, # P < 0.05, ## P < 0.01; 与模型组比较, Δ P < 0.05, ΔΔ P < 0.01

炎症和氧化应激损伤^[12]。ROS 大量生成导致抗氧化酶 SOD、CAT 被过度消耗,过剩的 ROS 将攻击细胞膜磷脂双分子层结构、诱导 Occludin 蛋白降解,破坏 TJPs 结构而使 BBB 通透性升高^[13]。Dohgu 等^[14]和赵军苍等^[15]研究发现 IL-1β、IL-6、TNF-α 等炎性细胞因子能够破坏 TJPs 结构并诱导内皮细胞黏附分子表达,导致 BBB 通透性升高。本研究发现,经 AND 或 NMP 治疗能够明显降低脑出血大鼠神经功能缺失评分、脑含水量、脑血肿体积和 BBB 通透性,上调 Claudin-5、Occludin、ZO-1 表达,降低 MDA、IL-1β、IL-6、TNF-α 含量并提高 SOD、CAT 活性,AND 高剂量组作用优于 NMP 组,提示 AND 对 BBB 结构和通透性具有保护作用,其机制可能与抑制氧化应激和炎症反应有关。

Nrf2 核转位后能够诱导抗氧化酶表达,提高 ROS 清除能力而降低氧化应激损伤。HO-1 为 Nrf2 靶基因,能够诱导 ROS 还原清除。NF-κB 能够诱导炎性细胞因子表达,进而介导炎症反应,Dang 等^[16]研究发现,HO-1 能够抑制 NF-κB 活化,从而间接抑制炎症反应。MMP9 能够降解 BBB 基膜,顾双双等^[17]研究发现,MMP9 表达量升高能够促进 BBB 通透性的增高。Qin 等^[18]研究发现,MMP9 表达受 NF-κB 调控。本研究发现,经 AND 或 NMP 治疗能够显著上调 Nrf2、HO-1 表达并下调 NF-κB、MMP9 表达。

综上所述,AND 对脑出血大鼠 BBB 结构和通透性具有保护作用,其机制可能与激活 Nrf2/HO-1 通路、抑制氧化应激和炎症反应、下调 MMP9 表达有关。

参考文献

1 顾云鹤,张默娇,王宏达,等. MMP-9 抑制剂对大鼠脑出血模

型脑水肿程度的影响及其对血脑屏障的作用[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(12): 2157-2161

2 Castro P, Azevedo E, Serrador J, et al. Hemorrhagic transformation and cerebral edema in acute ischemic stroke: link to cerebral autoregulation [J]. J Neurol Sci, 2017, 372(6): 256-261

3 于焱, 赵伟, 吴俊, 等. 自发性脑出血患者凝血功能与脑血肿及脑水肿的关系[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2021, 23(8): 836-838

4 任辉邦, 张斌, 尹启超, 等. 山姜素通过 PI₃K/Nrf2/HO-1 通路减少炎症和氧化应激反应改善盲肠结扎和穿孔诱导的脓毒症大鼠的急性肺损伤[J]. 免疫学杂志, 2021, 37(7): 575-583

5 Xie S, Deng W, Chen J, et al. Andrographolide protects against adverse cardiac remodeling after myocardial infarction through enhancing Nrf2 signaling pathway [J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(1): 12-26

6 Pan CW, Yang SX, Pan ZZ, et al. Andrographolide ameliorates d-galactosamine/lipopolysaccharide-induced acute liver injury by activating Nrf2 signaling pathway [J]. Oncotarget, 2017, 8(25): 41202-41210

7 孟令丽, 李楠, 刘曼, 等. 大鼠脑出血模型的建立及评价[J]. 华北理工大学学报: 医学版, 2016, 18(5): 346-348

8 刘志明, 黄山, 常柄权, 等. 藏荆芥提取物对脑出血大鼠 AQP-4 及 NGF 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(9): 150-154

9 邱珂, 邓淑文, 刘慧, 等. 丁苯酞对 SD 大鼠脑出血后血脑屏障的影响及其机制[J]. 中南大学学报: 医学版, 2019, 44(12): 1321-1329

10 Hashimoto Y, Tachibana K, Krug SM, et al. Potential for tight junction protein-directed drug development using claudin binders and angubindin-1 [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(16): 4016-4023

11 Berndt P, Winkler L, Cording J, et al. Tight junction proteins at the blood-brain barrier: far more than claudin-5 [J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(10): 1987-2002

12 任巧, 张林, 刘小慧, 等. β 淀粉样蛋白 1-42 寡聚体对人诱导性多能干细胞源性小胶质细胞炎症和氧化应激反应的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2020, 34(11): 817-824

13 Wang X, Liu Y, Sun Y, et al. Blood brain barrier breakdown was found in non-infarcted area after 2-h MCAO [J]. J Neurol Sci, 2016, 363(11): 63-68

14 Dohgu S, Takata F, Matsumoto J, et al. Monomeric α-synuclein induces blood-brain barrier dysfunction through activated brain pericytes releasing inflammatory mediators in vitro [J]. Microvasc Res, 2019, 124(7): 61-66

15 赵军苍, 郭宏盛, 李永召, 等. 大蒜素对脑出血大鼠血脑屏障通透性的影响及机制研究[J]. 心脑血管病防治, 2021, 21(3): 234-238

16 Dang X, He B, Ning Q, et al. Alantolactone suppresses inflammation, apoptosis and oxidative stress in cigarette smoke-induced human bronchial epithelial cells through activation of Nrf2/HO-1 and inhibition of the NF-κB pathways [J]. Respir Res, 2020, 21(1): 95-107

17 顾双双, 沙杜鹃, 高凤娟, 等. 基质金属蛋白酶 9 和中性粒细胞/淋巴细胞比值预测自发性脑出血患者的迟发性血肿周围脑水肿[J]. 国际脑血管病杂志, 2021, 29(2): 114-119

18 Qin W, Li J, Zhu R, et al. Melatonin protects blood-brain barrier integrity and permeability by inhibiting matrix metalloproteinase-9 via the NOTCH3/NF-κB pathway [J]. Aging: Albany NY, 2019, 11(23): 11391-11415

(收稿日期: 2021-11-30)

(修回日期: 2021-12-20)