

倪礼礼,姚佳,汪学猛,等. 基于 NOS 通路探讨 DAHP 对脑外伤大鼠的神经保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(12): 35-42.

Ni LL, Yao J, Wang XM, et al. Neuroprotective effect of DAHP on rats with brain injuries via the NOS pathway [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(12): 35-42.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.12.006

基于 NOS 通路探讨 DAHP 对脑外伤大鼠的神经保护作用

倪礼礼^{1*}, 姚佳¹, 汪学猛², 杜煜¹

(1. 洛阳职业技术学院食品与药品学院, 河南 洛阳 471900; 2. 信阳职业技术学院药学院, 河南 信阳 464000)

【摘要】 目的 探究 2,4-二胺-6-羟基嘧啶(DAHP)对脑外伤大鼠的神经保护作用,初步探究其可能的作用机制。**方法** 采用 Feeney 法制备脑外伤大鼠模型,将造模成功的 SD 大鼠随机分为模型组、DAHP 组、NOS 激活剂组(四氢生物蝶呤(BH4)组)、DAHP+BH4 组,每组 12 只,另选取 12 只大鼠仅打开骨窗不采取打击器打击作为假手术组。造模后 2 h,DAHP 组尾静脉注射 0.5 g/kg 的 DAHP, BH4 组尾静脉注射 0.3 mg/kg 的 BH4, DAHP+BH4 组尾静脉注射 0.5 g/kg 的 DAHP 与 0.3 mg/kg 的 BH4,假手术组、模型组均注射等量生理盐水,注射体积均为 10 mL/kg,每天给药 1 次,连续处理 1 周。末次处理后,采用定位航行、空间探索实验评估大鼠行为学;苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠脑组织形态学变化;Tunel 染色观察脑组织细胞凋亡;Griess 法检测脑组织一氧化氮(NO)水平;免疫印迹法检测大鼠脑组织中神经型一氧化氮合酶(nNOS)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、核因子- κ B(NF- κ B)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、环氧化酶-2(COX-2)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)蛋白表达情况。**结果** 假手术组脑组织神经细胞形态正常,细胞核着色均匀;模型组神经细胞发生肿胀、变形、细胞核固缩,伴有炎性细胞浸润;与模型组相比,DAHP 组神经细胞组织形态得到一定缓解,炎性浸润程度减轻, BH4 组坏死神经细胞数量增多,损伤程度加重, DAHP+BH4 组细胞形态变化不显著。与假手术组相比,模型组大鼠逃避潜伏期延长,空间探索时间比例、脑组织 Bcl-2 蛋白降低,脑组织细胞凋亡率、nNOS、iNOS 蛋白表达、NO 水平、NF- κ B、TNF- α 、COX-2、Caspase-3 蛋白表达升高($P<0.05$)。与模型组相比,DAHP 组大鼠逃避潜伏期缩短,空间探索时间比例、脑组织 Bcl-2 蛋白升高,脑组织细胞凋亡率、nNOS、iNOS 蛋白表达、NO 水平、NF- κ B、TNF- α 、COX-2、Caspase-3 蛋白表达降低($P<0.05$)。与模型组相比, BH4 组大鼠逃避潜伏期延长,空间探索时间比例、脑组织 Bcl-2 蛋白降低,脑组织细胞凋亡率、nNOS、iNOS 蛋白表达、NO 水平、NF- κ B、TNF- α 、COX-2、Caspase-3 蛋白表达升高($P<0.05$)。DAHP+BH4 组大鼠逃避潜伏期、脑组织细胞凋亡率、nNOS、iNOS 蛋白表达、NO 水平、NF- κ B、TNF- α 、COX-2、Caspase-3 蛋白表达低于 BH4 组,空间探索时间比例、脑组织 Bcl-2 蛋白表达高于 BH4 组($P<0.05$)。**结论** DAHP 可缓解脑外伤大鼠神经功能损伤,减轻脑组织神经细胞凋亡,其机制可能与抑制 iNOS 信号通路有关。

【关键词】 脑外伤;神经损伤;2,4-二胺-6-羟基嘧啶;一氧化氮合酶;一氧化氮

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 12-0035-08

Neuroprotective effect of DAHP on rats with brain injuries via the NOS pathway

NI Lili^{1*}, YAO Jia¹, WANG Xuemeng², DU Yu¹

(1. College of Food and Medicine, Luoyang Polytechnic College, Luoyang 471900, China.

2. School of Pharmacy, Xinyang Polytechnic College, Xinyang 464000)

【基金项目】 河南省医学科技攻关计划项目(202002149)。

【作者简介】 倪礼礼(1989—),女,硕士,讲师,研究方向:药物化学、药理学。E-mail: nilili824@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the neuroprotective effect of 2,4-diamino-6-hydroxypyrimidine (DAHP) on rats with brain injuries and its possible mechanism. **Methods** SD rat models of brain trauma were prepared by the Feeney method. The rats were randomly divided into model, DAHP, NOS activator [tetrahydrobiopterin (BH4)], and DAHP+BH4 groups with 12 rats in each group. Another 12 rats were used for the sham operation group that only underwent bone window opening without percussion. Two hours after modeling, the DAHP group was injected with 0.5 g/kg DAHP through the caudal vein, the BH4 group was injected with 0.3 mg/kg BH4 through the caudal vein, the DAHP+BH4 group was injected with 0.5 g/kg DAHP and 0.3 mg/kg BH4 through the caudal vein, and sham operation and model groups were injected with the same volume of normal saline at an injection volume of 10 mL/kg once a day for 1 week. After the last treatment, rat behavior was assessed by positioning navigation and space exploration experiments. Hematoxylin-eosin staining was used to observe histomorphology of the rat brain. TUNEL staining was used to observe apoptosis of brain cells. The Griess method was used to measure the level of nitric oxide (NO) in brain tissue, and expression of neuronal nitric oxide synthase (nNOS), inducible nitric oxide synthase (iNOS), nuclear factor- κ B (NF- κ B), tumor necrosis factor- α (TNF- α), cyclooxygenase-2 (COX-2), Caspase-3, and B-lymphoma-2 (Bcl-2) in brain tissue was detected by Western blot. **Results** In the sham operation group, the morphology of nerve cells in brain tissue was normal and nuclei were stained evenly. In the model group, nerve cells had swelled, deformed, and underwent nuclear pyknosis, which were accompanied by inflammatory cell infiltration. Compared with the model group, the morphology of nerve cells in the DAHP group was improved to some extent and the degree of inflammatory cell infiltration was reduced. The number of necrotic nerve cells was increased and the degree of injury was aggravated in the BH4 group. Morphological changes of nerve cells in the DAHP+BH4 group were not significant. Compared with the sham operation group, escape latency was prolonged; the proportion of space exploration time and Bcl-2 protein in brain tissue were decreased; and the apoptosis rate, NO level, and nNOS, iNOS, NF- κ B, TNF- α , COX-2, and Caspase-3 protein expression were increased in brain tissue of the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, escape latency was shortened; the proportion of space exploration time and Bcl-2 protein in brain tissue were increased; and the apoptosis rate, NO level, and nNOS, iNOS, NF- κ B, TNF- α , COX-2, and Caspase-3 protein expression in brain tissue were decreased in the DAHP group ($P < 0.05$). Compared with the model group, escape latency was prolonged; the proportion of space exploration time and Bcl-2 protein in brain tissue were decreased; and the apoptosis rate, NO level, and nNOS, iNOS, NF- κ B, TNF- α , COX-2, and Caspase-3 protein expression in brain tissue were increased in the BH4 group ($P < 0.05$). The escape latency; apoptosis rate in brain tissue; NO level; and nNOS, iNOS, NF- κ B, TNF- α , COX-2, and Caspase-3 protein expression in the DAHP+BH4 group was lower than those in the BH4 group and the proportion of space exploration time and Bcl-2 protein expression in brain tissue were higher than those in the BH4 group ($P < 0.05$). **Conclusions** DAHP alleviates neurological impairment and reduces neuronal apoptosis in rats with brain injuries and its mechanism may be related to inhibition of the iNOS signaling pathway.

【Keywords】 brain injury; nerve injury; 2,4-diamino-6-hydroxypyrimidine; nitric oxide synthase; nitric oxide

脑外伤属于临床常见颅脑损伤类型之一,通常会造成患者行为、精神、记忆学习等方面功能障碍,具有较高的致死率和致残率,严重影响患者生活质量^[1]。脑外伤机制较复杂,主要涉及神经损伤、脑水肿、血脑屏障等,目前尚未有统一定论。一氧化氮(nitric oxide, NO)属于神经介质,正常状态下少量NO可调节血流、扩张血管,而过量的NO则会对神经细胞产生毒性^[2]。研究发现脑损伤后可激活一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)生成大量的NO,进而加重神经损伤^[3]。2,4-二胺-6-羟基嘧啶(2,4-diamino-6-hydroxypyrimidine, DAHP)为三磷酸鸟苷环化水解酶1(guanosine triphosphate cyclohydrolase 1, GCH1)抑制剂,可通过抑制GCH1

的合成进而降低诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达,影响NO的合成,然而其在脑损伤中的作用研究不多^[4]。本研究通过复制脑外伤模型大鼠,并给予DAHP干预,旨在探究其对脑外伤大鼠的神经保护作用及可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

70只SPF级SD健康大鼠,雄性,8周龄,体重(200±20)g,由河南环宇康禾生物科技有限公司提供[SCXK(豫)2020-0004],动物饲养在洛阳职业技术学院食品与药品学院实验室[SYXK(豫)2020-0027],湿度(40±10)%,温度(22±3)℃,采用昼夜

交替 12 h 光照,期间大鼠自由饮食、饮水,一周后用于造模,实验遵循 3R 原则。本研究经洛阳职业技术学院伦理委员会批准(LDS2020024)。

1.2 主要试剂与仪器

DAHP (购自美国 Cayman 公司,批号:81260-1);四氢生物蝶呤(tetrahydrobiopterin, BH4) (购自美国 MCE 公司,批号:HY-107383);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(购自碧云天生物技术有限公司,批号:C0105);Tunel 细胞凋亡检测试剂盒(购自美国 ROCHE 公司,批号:11684817910);NO 检测试剂盒(购自美国 Solarbio 公司,批号:BC147);BCA 蛋白检测试剂盒(购自美国 Thermo Scientific 公司,批号:23225);兔抗鼠神经型一氧化氮合酶(nNOS)、iNOS、 β -肌动蛋白(β -actin)一抗(购自美国 Sigma 公司,批号:SAB4502010、SAB4502012、A5441);兔抗鼠核因子- κ B(NF- κ B)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、环氧化酶-2(COX-2)一抗(购自美国 R&D 公司,批号:MAB5078、AF-425-PB、AF4198);兔抗鼠半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)一抗、辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(购自英国 Abcam 公司,批号:ab179517、ab185002、ab10032);光学显微镜(购自日本奥林巴斯公司,型号:IX51);荧光显微镜(购自舜宇光学科技集团有限公司,型号:CX40);酶标仪(购自美国 BioTek 公司,型号:Synergy NEO2);凝胶成像仪(购自德国 Royal 公司,型号:Gel IX Imager)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制备

随机挑选 58 只大鼠进行造模,另选取 12 只大鼠作为假手术组,参照改良 Feeney 法制备脑挫伤大鼠^[5],自制打击器,将打击器在大鼠脑表面上方垂直固定,将打击器沿着金属套管自 30 cm 高度垂直落下打击大鼠头部,造成右侧脑半球脑挫裂伤。造模后 2 h,待大鼠清醒后根据 Longa 等^[6]神经功能缺损评定标准对大鼠神经功能进行评定,将评分 2~3 分大鼠纳入模型,剔除操作不当、未成功大鼠,造模成功大鼠 48 只。假手术组仅打开骨窗不采取打击器打击。

1.3.2 动物分组与给药

将造模成功大鼠随机分为模型组、DAHP 组、NOS 激活剂组(BH4 组)、DAHP+BH4 组,每组 12 只。DAHP 组:造模后 2 h 尾静脉注射 0.5 g/kg 的 DAHP^[7];BH4 组:造模后 2 h 尾静脉注射 0.3 mg/kg 的 BH4^[8],DAHP+BH4 组:造模后 2 h 尾静脉注

射 0.5 g/kg 的 DAHP 与 0.3 mg/kg 的 BH4;假手术组、模型组均注射等量生理盐水;注射体积均为 10 mL/kg,各组每天给药 1 次,连续处理 1 周。

1.3.3 定位航行、空间探索实验评估大鼠行为学

末次处理后,评估大鼠行为学。将水池 4 象限中点作为入水点,将大鼠从随意象限放入水池面对池壁,记录大鼠寻找逃避平台的时间,为逃避潜伏期。撤去逃避平台,将大鼠从原平台对侧放入水池中,连续记录游泳 120 s 内在各象限所用时间,计算原平台象限游泳时间与逃避潜伏期比例,即为空间探索时间比例。

1.3.4 HE 染色观察大鼠脑组织形态学变化

行为学评估结束后,将大鼠处死,获取全脑组织,在 4%多聚甲醛中过夜固定后,取损伤区,制备脑组织石蜡切片,厚度为 3 μ m,参考 HE 染色试剂盒对切片进行染色,经乙醇脱水、二甲苯透明、树胶封片后,在光学显微镜下观察脑组织形态学变化。

1.3.5 Tunel 染色观察脑组织细胞凋亡

制备脑组织冰冻切片,添加蛋白酶 K 溶液室温下孵育 10 min,清洗后,添加 TdT 缓冲液孵育 20 min,避光添加 Tunel 工作液孵育 1 h,清洗后封片,置于荧光显微镜下观察细胞染色情况。用 Image-Pro 软件定量分析脑组织细胞凋亡率=绿色荧光细胞数/细胞总数 $\times$ 100%。

1.3.6 脑组织中 NO 水平的测定

将脑组织剪切为碎块后,添加 9 倍体积生理盐水,置于匀浆器内匀浆,采用 Griess 法检测脑组织 NO 水平。

1.3.7 免疫印迹法检测脑组织中蛋白表达

TRIzol 法提取脑组织总蛋白,BCA 法检测蛋白含量,统一定量 30 μ g 进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白转移至 PVDF 膜上,经 5%脱脂奶粉封闭后加入 nNOS、iNOS、NF- κ B、TNF- α 、COX-2、Caspase-3、Bcl-2、 β -actin 一抗(均为 1:1000),4 $^{\circ}$ C 过夜孵育后,用 HRP 标记二抗(1:5000)37 $^{\circ}$ C 孵育膜 2 h,添加 ECL 显色液曝光后,用凝胶成像系统采集图像,以 β -actin 作为内参,定量评估各蛋白相对表达水平。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行数据统计分析,计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK- q 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠行为学比较

与假手术组相比,模型组逃避潜伏期延长,空间探索时间比例降低($P<0.05$);与模型组相比,DAHP 组逃避潜伏期缩短,空间探索时间比例升高,BH4 组逃避潜伏期延长,空间探索时间比例降低($P<0.05$);DAHP+BH4 组逃避潜伏期短于 BH4 组,空间探索时间比例高于 BH4 组($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠逃避潜伏期、空间探索时间比例比较($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 1 Comparison of escape latency and proportion of space exploration time of rats in each group

组别 Groups	逃避潜伏期(s) Escape latency	空间探索时间比例(%) Proportion of space exploration time
假手术组 Sham operation group	37.47±4.64	58.65±4.51
模型组 Model group	61.64±8.75 ^a	37.18±3.46 ^a
DAHP 组 DAHP group	45.24±4.68 ^{ab}	44.89±3.42 ^{ab}
BH4 组 BH4 group	72.16±7.43 ^{abc}	29.87±3.41 ^{abc}
DAHP+BH4 组 DAHP+BH4 group	62.58±8.13 ^{acd}	36.11±4.38 ^{acd}

注:与假手术组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与 DAHP 组相比,^c $P<0.05$;与 BH4 组相比,^d $P<0.05$ 。

Note. Compared with sham operation group, ^a $P<0.05$. Compared with model group, ^b $P<0.05$. Compared with DAHP group, ^c $P<0.05$. Compared with BH4 group, ^d $P<0.05$.

2.2 DAHP 对大鼠脑组织形态学的影响

假手术组脑组织神经细胞形态正常,排列有序,细胞核着色均匀;模型组神经细胞发生肿胀、变形、细胞核固缩,着色加深,坏死细胞增多,伴有炎性细胞浸润;与模型组相比,DAHP 组神经细胞组织形态得到一定缓解,坏死细胞减少,炎性浸润程度减轻,BH4 组坏死神经细胞数量增多,细胞核固缩,染色变深,损伤程度加重,DAHP+BH4 组细胞形态变化不显著。见图 1。

2.3 DAHP 对大鼠脑组织细胞凋亡的影响

与假手术组相比,模型组大鼠脑组织细胞凋亡率升高($P<0.05$);与模型组相比,DAHP 组大鼠脑组织细胞凋亡率降低,BH4 组大鼠脑组织细胞凋亡率升高($P<0.05$);DAHP+BH4 组大鼠脑组织细胞凋亡率低于 BH4 组($P<0.05$)。见图 2 和表 2。

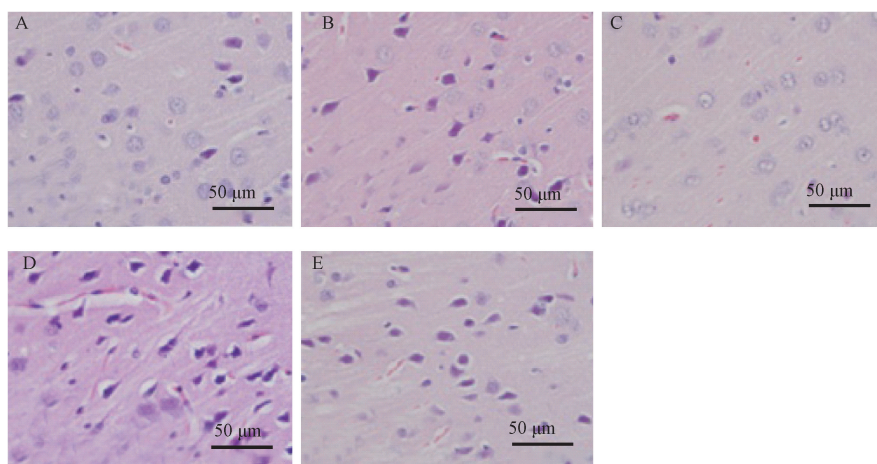
表 2 各组大鼠脑组织细胞凋亡率比较($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 2 Comparison of apoptosis rate of brain tissue in each group

组别 Groups	凋亡率(%) Apoptosis rate
假手术组 Sham operation group	0
模型组 Model group	38.19±4.36 ^a
DAHP 组 DAHP group	27.87±3.64 ^{ab}
BH4 组 BH4 group	47.64±4.97 ^{abc}
DAHP+BH4 组 DAHP+BH4 group	38.73±4.13 ^{acd}

注:与假手术组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与 DAHP 组相比,^c $P<0.05$;与 BH4 组相比,^d $P<0.05$ 。

Note. Compared with sham operation group, ^a $P<0.05$. Compared with model group, ^b $P<0.05$. Compared with DAHP group, ^c $P<0.05$. Compared with BH4 group, ^d $P<0.05$.



注:A:假手术组;B:模型组;C:DAHP 组;D:BH4 组;E:DAHP+BH4 组。

图 1 HE 染色检测脑组织形态学变化

Note. A, Sham operation group. B, Model group. C, DAHP group. D, BH4 group. E, DAHP+BH4 group.

Figure 1 HE staining was used to detect the morphological changes of brain tissue

2.4 DAHP 对大鼠脑组织 NOS 通路的影响

与假手术组相比,模型组大鼠脑组织 nNOS、iNOS 蛋白表达、NO 水平升高 ($P<0.05$);与模型组相比,DAHP 组大鼠脑组织 nNOS、iNOS 蛋白表达、NO 水平降低,BH4 组大鼠脑组织 nNOS、iNOS 蛋白表达、NO 水平升高 ($P<0.05$);DAHP+BH4 组大鼠脑组织 nNOS、iNOS 蛋白表达、NO 水平低于 BH4 组 ($P<0.05$)。见图 3 和表 3。

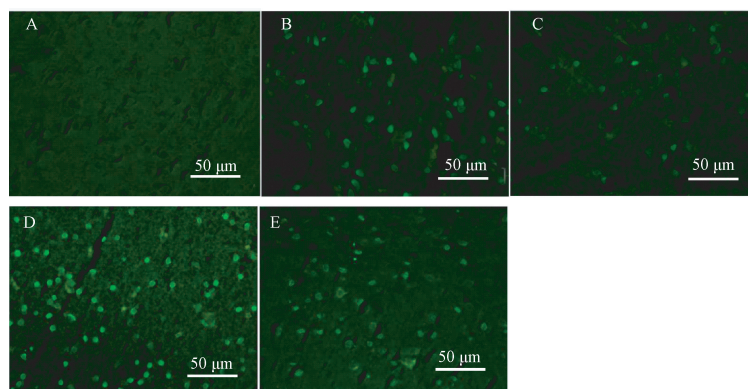
2.5 DAHP 对大鼠脑组织炎症因子 NF- κ B、TNF- α 、COX-2 的影响

与假手术组相比,模型组大鼠脑组织 NF- κ B、TNF- α 、COX-2 蛋白表达升高 ($P<0.05$);与模型组相比,DAHP 组大鼠脑组织 NF- κ B、TNF- α 、COX-2 蛋

白表达降低,BH4 组大鼠脑组织 NF- κ B、TNF- α 、COX-2 蛋白表达升高 ($P<0.05$);DAHP+BH4 组大鼠脑组织 NF- κ B、TNF- α 、COX-2 蛋白表达低于 BH4 组 ($P<0.05$)。见图 4 和表 4。

2.6 DAHP 对大鼠脑组织凋亡蛋白表达的影响

与假手术组相比,模型组大鼠脑组织 Caspase-3 蛋白表达升高,Bcl-2 蛋白表达降低 ($P<0.05$);与模型组相比,DAHP 组大鼠脑组织 Caspase-3 蛋白表达降低,Bcl-2 蛋白表达升高,BH4 组大鼠脑组织 Caspase-3 蛋白表达升高,Bcl-2 蛋白表达降低 ($P<0.05$);DAHP+BH4 组大鼠脑组织 Caspase-3 蛋白表达低于 BH4 组,Bcl-2 蛋白表达高于 BH4 组 ($P<0.05$)。见图 5 和表 5。



注:A:假手术组;B:模型组;C:DAHP 组;D:BH4 组;E:DAHP+BH4 组。

图 2 TUNEL 染色检测脑组织细胞凋亡情况

Note. A, Sham operation group. B, Model group. C, DAHP group. D, BH4 group. E, DAHP+BH4 group.

Figure 2 TUNEL staining was used to detect apoptosis in brain tissue

表 3 各组大鼠脑组织中 nNOS、iNOS、NO 水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 3 Comparison of nNOS, iNOS and NO levels in brain tissue of rats in each group

组别 Groups	nNOS/ β -actin	iNOS/ β -actin	NO (μ mol/L)
假手术组 Sham operation group	0.19 $\pm$ 0.03	0.21 $\pm$ 0.04	1.03 $\pm$ 0.03
模型组 Model group	0.38 $\pm$ 0.05 ^a	0.82 $\pm$ 0.08 ^a	1.64 $\pm$ 0.11 ^a
DAHP 组 DAHP group	0.26 $\pm$ 0.04 ^{ab}	0.51 $\pm$ 0.05 ^{ab}	1.39 $\pm$ 0.05 ^{ab}
BH4 组 BH4 group	0.51 $\pm$ 0.06 ^{abc}	1.04 $\pm$ 0.13 ^{abc}	1.92 $\pm$ 0.07 ^{abc}
DAHP+BH4 组 DAHP+BH4 group	0.40 $\pm$ 0.05 ^{acd}	0.79 $\pm$ 0.08 ^{acd}	1.62 $\pm$ 0.12 ^{acd}

注:与假手术组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与 DAHP 组相比,^c $P<0.05$;与 BH4 组相比,^d $P<0.05$ 。

Note. Compared with sham operation group, ^a $P<0.05$. Compared with model group, ^b $P<0.05$. Compared with DAHP group, ^c $P<0.05$. Compared with BH4 group, ^d $P<0.05$.

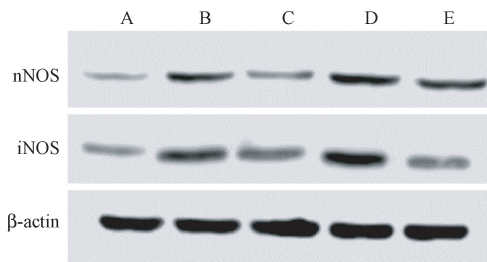
表 4 各组大鼠脑组织中 NF- κ B、TNF- α 、COX-2 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 4 Comparison of protein expression of NF- κ B, TNF- α and COX-2 in brain tissue of rats in each group

组别 Groups	NF- κ B/ β -actin	TNF- α / β -actin	COX-2/ β -actin
假手术组 Sham operation group	0.16 $\pm$ 0.03	0.15 $\pm$ 0.03	0.16 $\pm$ 0.03
模型组 Model group	0.95 $\pm$ 0.09 ^a	0.61 $\pm$ 0.07 ^a	0.66 $\pm$ 0.09 ^a
DAHP 组 DAHP group	0.33 $\pm$ 0.04 ^{ab}	0.28 $\pm$ 0.05 ^{ab}	0.43 $\pm$ 0.08 ^{ab}
BH4 组 BH4 group	1.14 $\pm$ 0.11 ^{abc}	0.89 $\pm$ 0.12 ^{abc}	0.87 $\pm$ 0.07 ^{abc}
DAHP+BH4 组 DAHP+BH4 group	0.97 $\pm$ 0.07 ^{acd}	0.63 $\pm$ 0.09 ^{acd}	0.68 $\pm$ 0.06 ^{acd}

注:与假手术组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与 DAHP 组相比,^c $P<0.05$;与 BH4 组相比,^d $P<0.05$ 。

Note. Compared with sham operation group, ^a $P<0.05$. Compared with model group, ^b $P<0.05$. Compared with DAHP group, ^c $P<0.05$. Compared with BH4 group, ^d $P<0.05$.

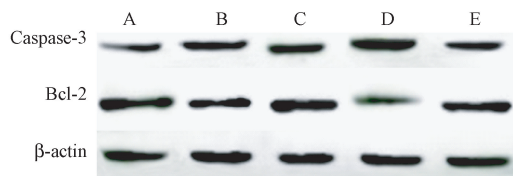


注:A:假手术组;B:模型组;C:DAHP 组;D:BH4 组;E:DAHP+BH4 组。

图 3 免疫印迹法检测大鼠脑组织中 nNOS、iNOS 蛋白表达

Note. A, Sham operation group. B, Model group. C, DAHP group. D, BH4 group. E, DAHP+BH4 group.

Figure 3 Western blot was used to detect the protein expression of nNOS and iNOS in rat brain

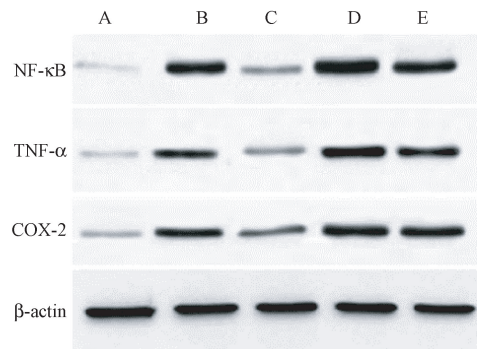


注:A:假手术组;B:模型组;C:DAHP 组;D:BH4 组;E:DAHP+BH4 组。

图 5 免疫印迹法检测大鼠脑组织中凋亡蛋白表达情况

Note. A, Sham operation group. B, Model group. C, DAHP group. D, BH4 group. E, DAHP+BH4 group.

Figure 5 Western blot was used to detect the expression of apoptotic protein in rat brain



注:A:假手术组;B:模型组;C:DAHP 组;D:BH4 组;E:DAHP+BH4 组。

图 4 免疫印迹法检测脑组织中 NF-κB、TNF-α、COX-2 蛋白表达

Note. A, Sham operation group. B, Model group. C, DAHP group. D, BH4 group. E, DAHP+BH4 group.

Figure 4 Western blot was used to detect the protein expression of NF-κB, TNF-α and COX-2 in brain tissue

表 5 各组大鼠脑组织中 Caspase-3、Bcl-2 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 5 Comparison of Caspase-3 and Bcl-2 protein expression in brain tissue of rats in each group

组别 Groups	Caspase-3/β-actin	Bcl-2/β-actin
假手术组 Sham operation group	0.25±0.03	1.25±0.15
模型组 Model group	0.63±0.08 ^a	0.41±0.06 ^a
DAHP 组 DAHP group	0.45±0.05 ^{ab}	0.55±0.05 ^{ab}
BH4 组 BH4 group	0.78±0.06 ^{abc}	0.22±0.03 ^{abc}
DAHP+BH4 组 DAHP+BH4 group	0.61±0.09 ^{acd}	0.42±0.05 ^{acd}

注:与假手术组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与 DAHP 组相比,^c $P<0.05$;与 BH4 组相比,^d $P<0.05$ 。

Note. Compared with sham operation group, ^a $P<0.05$. Compared with model group, ^b $P<0.05$. Compared with DAHP group, ^c $P<0.05$. Compared with BH4 group, ^d $P<0.05$.

3 讨论

继发性脑损伤后短时间内,脑组织中会出现的大量炎性细胞浸润,组织中炎症反应会进一步加重脑损伤程度,此外脑损伤后脑组织出现缺血、缺氧,造成细胞代谢异常,引发组织病理损伤,加速神经元死亡^[9]。本研究采用改良 Feeney 法制备脑外伤模型大鼠,经定位航行与空间探索实验发现模型组大鼠逃避潜伏期要显著长于假手术组,而空间探索时间比例明显低于假手术组,提示脑外伤导致大鼠记忆功能障碍,神经功能受损。HE 染色发现,模型组大鼠脑组织神经细胞发生肿胀、变形、细胞核固缩,着色加深,坏死细胞增多,伴有炎性细胞浸润,说明模型大鼠脑组织出现炎性损伤,神经细胞受损,这与以往脑外伤模型动物特征相似^[10],提示模

型大鼠脑组织受损,神经功能发生障碍,脑外伤大鼠模型制备成功。

NOS 信号通路与脑损伤的发生密切相关,其通过催化形成 NO,发挥对脑组织神经的保护或损伤作用。机体中的 NOS 主要包括内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、iNOS 及 nNOS,过往研究发现在脑损伤早期 eNOS 表达较高,通过催化生成 NO 发挥对脑组织的神经保护作用,而在脑损伤中、后期 nNOS、iNOS 大量表达则会释放对脑神经有害的 NO^[11]。Yong 等^[12]研究发现缺血再灌注损伤大鼠脑组织中 eNOS 水平降低,iNOS 水平升高,给予电针治疗后,能够显著上调 eNOS,下调 iNOS 水平,缓解神经功能缺损、神经元凋亡。川芎嗪类似物 CXC195 通过抑制 NADPH 氧化酶和 iNOS 的表达,发挥对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用^[13]。本研究发现,与假手

术组相比,模型组大鼠脑组织中 nNOS、iNOS 蛋白表达、NO 水平升高,提示 NOS 信号通路的激活与脑外伤的发生相关。

BH4 为炎症因子及神经递质合成的辅助因子,而 GCH1 为 BH4 合成主要限速酶,二者与神经损伤、疼痛的发生相关。DAHP 为 GCH1 抑制剂,可通过抑制 GCH1 的合成进而降低 BH4 合成,研究发现采用 DAHP 能够抑制 GCH1 的表达,进而降低 iNOS 的表达,影响 NO 的合成^[14]。近期有研究显示 DAHP 能够通过下调 iNOS 表达,进而降低脑缺血再灌注损伤大鼠梗死面积,减轻脑水肿,发挥对脑组织的保护作用^[15]。Li 等^[16]研究发现 DAHP 通过抑制凋亡和激活磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路对发挥对局灶性脑缺血的保护作用^[16]。本研究发现采用 BH4 处理模型大鼠后,逃避潜伏期延长,空间探索时间比例降低,脑组织损伤程度加重;而采用 BH4 联合 DAHP 处理模型大鼠后,与 BH4 组比较,大鼠逃避潜伏期缩短,空间探索时间比例升高,脑组织损伤程度有所缓解,提示 DAHP 可通过抑制 iNOS 信号通路的表达,进而缓解脑外伤大鼠脑组织神经损伤。在脑损伤后过量炎症反应会导致 COX-2、iNOS 表达升高,过往研究发现在脑损伤后 24 h 内,COX-2 达到最大值,其水平与病情严重程度密切相关^[17]。此外脑损伤后 NF- κ B 表达大量升高,进一步刺激 iNOS 合成大量的 NO,上调促炎症因子 TNF- α 表达,加重炎症损伤^[18]。本研究发现模型组大鼠脑组织中 COX-2、NF- κ B、TNF- α 蛋白表达明显升高,给予 BH4 后能够进一步升高上述炎症因子的表达,联合 DAHP 后则能抑制上述炎症因子的表达,提示 DAHP 可能通过抑制 NOS 表达进而缓解对脑外伤大鼠炎症损伤。

神经细胞凋亡参与脑损伤的发生、发展过程,细胞凋亡数量的多少,与损伤严重程度密切相关^[19]。本研究通过 Tunel 染色检测发现,模型组大鼠脑组织中神经细胞凋亡率明显升高,给予 BH4 处理后细胞凋亡加重,联合 DAHP 处理后细胞凋亡降低,提示 DAHP 可通过减轻神经细胞凋亡,保护脑组织。Caspase-3 是细胞死亡的最终执行者,而 Bcl-2 作为抗凋亡蛋白能够抑制 Caspase-3 激活,阻断 Bax 等凋亡蛋白的激活,研究发现脑损伤后 24 h Caspase-3 表达达到最高峰,而 Bcl-2 表达则最低^[20]。本研究发现模型组大鼠脑组织中 Caspase-3

蛋白表达升高,Bcl-2 蛋白表达降低,给予 BH4 后能够 Caspase-3 蛋白表达进一步升高,Bcl-2 蛋白表达进一步降低,联合 DAHP 后 Caspase-3 蛋白表达降低,Bcl-2 蛋白表达升高,提示 DAHP 可能通过抑制凋亡蛋白激活,发挥抗凋亡作用,保护脑外伤大鼠神经功能。

综上所述,DAHP 能够缓解脑外伤大鼠脑组织神经细胞凋亡,降低炎症损伤,缓解神经功能障碍,其机制可能与抑制 iNOS 信号通路有关。然而本研究也存在不足,脑外伤机制较复杂,DAHP 是否还通过其他途径发挥对脑组织神经保护作用,尚待后续深入探究。

参考文献:

- [1] Zachar-Tirado R, Chen Z, Donders J, et al. Clinical utility of the patient health questionnaire-adolescent in adolescents with traumatic brain injury [J]. J Head Trauma Rehabil, 2021, 36(2): E118-E125.
- [2] Chung HJ, Kim M, Jung J, et al. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by ethyl pyruvate in schwann cells protects against peripheral nerve degeneration [J]. Neurochem Res, 2019, 44(8): 1964-1976.
- [3] Huang L, Zhang L, Liu Z, et al. Pentamidine protects mice from cecal ligation and puncture-induced brain damage via inhibiting S100B/RAGE/NF- κ B [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 517(2): 221-226.
- [4] Qin Y, Hu W, Yang Y, et al. Neuroprotective effect of DAHP via antiapoptosis in cerebral ischemia [J]. Behav Neurol, 2018, 2018: 5050469.
- [5] 王文宏,孔君,林小祥,等. bFGF 对颅脑损伤大鼠脑水肿、神经功能损伤及自噬相关蛋白表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(2): 320-325.
- [6] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson SR, et al. Reversible middle artery occlusion without craniectomy [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [7] 孙雅宜. DAHP 下调 NOS 通路和 TP 上调 PI3K/Akt 通路的抗炎抗凋亡作用对脑缺血的神保护机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [8] Rivera JC, Noueihed B, Madaan A, et al. Tetrahydrobiopterin (BH4) deficiency is associated with augmented inflammation and microvascular degeneration in the retina [J]. J Neuroinflammation, 2017, 14(1): 181-185.
- [9] Zhao J, Li L, Fang G, et al. Salvianolic acid A attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury induced rat brain damage, inflammation and apoptosis by regulating miR-499a/DDK1 [J]. Am J Transl Res, 2020, 12(7): 3288-3301.
- [10] 王景博,韦春珠,潘茂华,等. 活血化癥方剂对重型颅脑损伤大鼠 Wnt/ β -连环蛋白信号通路表达的影响 [J]. 中华危重病急救医学, 2020, 32(9): 1101-1106.

- [11] Blanco S, Hernández R, Franchelli G, et al. Melatonin influences NO/NOS pathway and reduces oxidative and nitrosative stress in a model of hypoxic-ischemic brain damage [J]. Nitric Oxide, 2017, 62(1): 32-43.
- [12] Yong Y, Guo J, Zheng D, et al. Electroacupuncture pretreatment attenuates brain injury in a mouse model of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation via the AKT/eNOS pathway [J]. Life Sci, 2019, 235(8): 116821-116829.
- [13] Liu H, Wei X, Chen L, et al. Tetramethylpyrazine analogue CXC195 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat by an antioxidant action via inhibition of NADPH oxidase and iNOS expression [J]. Pharmacology, 2013, 92(3-4): 198-206.
- [14] 王星, 杨峻岭, 樊秀娟, 等. GCH1 基因、BH4 对疼痛的作用机制研究进展 [J]. 中国现代医学杂志, 2019, 29(16): 44-47.
- [15] McNeill E, Crabtree MJ, Sahgal N, et al. Regulation of iNOS function and cellular redox state by macrophage Gch1 reveals specific requirements for tetrahydrobiopterin in NRF2 activation [J]. Free Radic Biol Med, 2015, 79: 206-216.
- [16] Li W, Yang Y, Hu Z, et al. Neuroprotective effects of DAHP and Triptolide in focal cerebral ischemia via apoptosis inhibition and PI3K/Akt/mTOR pathway activation [J]. Front Neuroanat, 2015, 9: 48.
- [17] Yan Y, Tong F, Chen J. Endogenous BMP-4/ROS/COX-2 mediated IPC and resveratrol alleviated brain damage [J]. Curr Pharm Des, 2019, 25(9): 1030-1039.
- [18] Qi J, Rong Y, Wang L, et al. Rab7b overexpression-ameliorated ischemic brain damage following tMCAO involves suppression of TLR4 and NF- κ B p65 [J]. J Mol Neurosci, 2019, 68(2): 163-170.
- [19] Fang H, Li HF, Yang M, et al. NF- κ B signaling pathway inhibition suppresses hippocampal neuronal apoptosis and cognitive impairment via RCAN1 in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage [J]. Cell Cycle, 2019, 18(9): 1001-1018.
- [20] Vasilikos L, Spilgies LM, Knop J, et al. Regulating the balance between necroptosis, apoptosis and inflammation by inhibitors of apoptosis proteins [J]. Immunol Cell Biol, 2017, 95(2): 160-165.

[收稿日期]2021-03-10

(上接第 13 页)

- [13] Wei S, Wang Y, Chai Q, et al. *In vivo* and *in vitro* effects of heme oxygenase-1 silencing on the survival of acute myelocytic leukemia-M2 cells [J]. Exp Ther Med, 2015, 9(3): 931-940.
- [14] 张坤, 徐昊森, 程涓, 等. 尾静脉注射 HL60/HL60/ADR 细胞建立 SCID beige 小鼠白血病动物模型的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(7): 43-51.
- [15] 尹君, 李景丁莎, 左从林, 等. 人源性肝癌细胞小鼠原位移植瘤模型的建立及特点的比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(12): 68-74.
- [16] 杨红, 刘建兴, 周泽平, 等. 应用 SCID 和 NOD/SCID 小鼠构建急性髓系白血病模型成瘤率的比较 [J]. 中国实验血液学杂志, 2015, 23(2): 328-334.
- [17] Shan WL, Ma XL. How to establish acute myeloid leukemia xenograft models using immunodeficient mice [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(12): 7057-7063.
- [18] Wu J, Zhang J, Jiang M, et al. Comparison between NOD/SCID mice and BALB/c mice for patient-derived tumor xenografts model of non-small-cell lung cancer [J]. Cancer Manag Res, 2018, 10: 6695-6703.
- [19] Shang Z, Wang J, Wang D, et al. Establishment of xenotransplantation model of human CN-AML with FLT3-ITD (mut)/NPM1 (-) in NOD/SCID mice [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2013, 33(3): 329-334.
- [20] Jozkowicz A, Was H, Dulak J. Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? [J]. Antioxid Redox Signal, 2007, 9(12): 2099-2117.
- [21] Hirai K, Sasahira T, Ohmori H, et al. Inhibition of heme oxygenase-1 by zinc protoporphyrin IX reduces tumor growth of LL/2 lung cancer in C57BL mice [J]. Int J Cancer, 2007, 120(3): 500-505.
- [22] Podkalicka P, Mucha O, Józkowicz A, et al. Heme oxygenase inhibition in cancers: possible tools and targets [J]. Contemp Oncol (Pozn), 2018, 22(1): 23-32.
- [23] Herrmann H, Kneidinger M, Cerny-Reiterer S, et al. The Hsp32 inhibitors SMA-ZnPP and PEG-ZnPP exert major growth-inhibitory effects on CD34⁺/CD38⁺ and CD34⁺/CD38⁻ AML progenitor cells [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2012, 12(1): 51-63.
- [24] Hassan N, Yang J, Wang JY. An improved protocol for establishment of AML patient-derived xenograft models [J]. STAR Protoc, 2020, 1(3): 100156.

[收稿日期]2020-10-28