

Nrf2 激活对 AGEs 诱导大鼠海马损伤的抗炎、抗氧化保护作用

董泗芹 徐松 侯训尧 罗鼎真 陈健 刘雪平

【摘要】 目的 探讨核因子红系 2 相关因子 2(nuclear factor erythroid derived 2-related factor 2, Nrf2) 激活剂莱菔硫烷(sulforaphane, SFP)对糖基化终末产物(advanced glycation products, AGEs)诱导大鼠海马氧化应激损伤和炎症反应的保护作用及其机制。**方法** 40 只 Wistar 大鼠被随机分为 4 组:生理盐水组(Control 组)、SFP 对照组、AGEs 组和 SFP 组,给予 AGEs 组及 SFP 组大鼠双侧海马立体定向注射 AGEs 5 μL ,造成 AGEs 组大鼠海马损伤,Control 组及 SFP 对照组注射等量的生理盐水作为对照;造模前 1 周给予 SFP 组和 SFP 对照组大鼠 5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SFP 腹腔注射,连续 4 周,AGEs 组及 Control 组则同时给予同体积的生理盐水,造模结束后 3 周进行 Morris 水迷宫实验,测定大鼠逃避潜伏期及穿越平台次数;生化试剂盒检测大鼠海马超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)活性及丙二醛(MDA)水平;ELISA 和 Western blot 法测定肿瘤坏死因子(TNF- α)以及白介素-1 β (IL-1 β)的表达水平。**结果** 与 Control 组比较,AGEs 组大鼠逃避潜伏期明显延长,穿越平台次数减少;海马氧化应激及炎症反应水平明显升高。SFP 组较 AGEs 组逃避潜伏期显著降低、穿越平台次数明显增加;海马组织抗氧化系统水平升高;炎症因子表达减少。**结论** SFP 作为 Nrf2 激动剂,能改善 AGEs 引起的氧化应激和炎症反应,具有神经保护作用。

【关键词】 糖基化终末产物 莱菔硫烷 氧化应激 p-NF- κB

【中图分类号】 R742 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2017)05-0388-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2017.05.002

Neuroprotective effects of Nrf2 agonist on AGEs induced hippocampus injury by attenuating oxidative stress and neuroinflammation Dong Siqin, Xu Song, Hou Xun Yao, et al. Department of Senile Neurology, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021

【Abstract】 Objective To investigate the protective effects of the Nrf2 agonist sulforaphane(SFP) on the advanced glycation products(AGEs)-induced oxidative stress and neuroinflammation and the related mechanisms. **Methods** Fourty Wistar rats were randomly divided into 4 groups: normal control(Control), SFP control, AGEs and SFP groups. The bilateral hippocampus of rats in AGEs group and SFP group were injected AGEs to make injuring rat models. Control group and SFP group were intraperitoneal injected SFP 5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for 4 weeks before the animal models were produced, rats in AGEs and Control groups were injected equal volume of saline intraabominally. Morris water maze was used for testing escape latency and the number of crossing, related kits were used for detecting superoxide dismutase(SOD) activity, glutathione peroxidase(GSH-Px) activity, catalase(CAT) and malondialdehyde(MDA) content in the hippocampus, Western blot and enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) were used for detecting the expression level of neuroinflammation factors, tumor necrosis factor(TNF- α) and interleukin-1 beta(IL-1 β). **Results** Compared with Control group, EL elevated, the number of crossings decreased, oxidative stress and neuroinflammatory cytokines levels increased significantly in AGEs induced injury rats. Compared with AGEs group, SFP obviously decreased EL, increased the number of crossings, increased SOD, GSH-Px, CAT activity and decreased MDA content, reduced the expression TNF- α and IL-1 β in SFP group. **Conclusion** Nrf2 agonist SFP obviously improved cognitive function in AGEs induced brain injury, also improved the antioxidant ability, lowered inflammation levels in the brain, and had neuroprotective effect.

【Key words】 Advanced glyctions(AGEs) Sulforaphane(SFP) Oxidative stress Inflammation

糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)是蛋白质的氨基、脂类或核酸等生物大分子和葡萄糖及其他还原糖的羰基经过糖基化反应生成的一类终末不可逆聚合物。AGEs 在体内随年龄的增长不断增多,可以与其受体(receptor for AGEs, RAGE)结合,从而激活下游信号传导通路,引起氧化应激、促炎症反应以及淀粉样蛋白的沉积等阿尔茨海默病(AD)样病理变化,也可引起糖尿病神经病变、血管病变、肾脏病变等诸多并发症的发生发展^[1-2]。因此,阻断 AGEs 的作用或可成为 AD 等衰老相关疾病防治的有效手段之一。核因子红系 2 相关因子 2(nuclear factor erythroid derived 2-related factor 2, Nrf2)是细胞内调节抗氧化反应的重要转录因子^[3]。近年来多项研究表明 Nrf2 激活后可以对多种疾病状态下的神经元起保护作用^[4]。但 Nrf2 激活对 AGEs 引起的神经元损伤作用及其机制仍不清楚,本研究拟探讨 Nrf2 激动剂莱菔硫烷(Sulforaphane, SFP)对 AGEs 所致的海马神经元损伤的保护作用,并从氧化应激和炎症反应来探讨其相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 40 只健康成年雄性 Wistar 大鼠购自山东大学齐鲁医学部实验动物中心,体重 250~280 g。给予标准啮齿类动物饲料喂养 1 周后继续自由进食和饮水,室温约 25℃,湿度约 50%。

1.1.2 主要试剂和仪器 SFP 购自加拿大多伦多 TRC 公司; AGEs-BSA(10 mg/ml)购自 Biovision 公司,小鼠抗 IL-1 β 多克隆抗体购自 CST 公司,兔抗 TNF- α 多克隆抗体购自 ImmunoWay 生物公司产品, SOD、GSH-Px、CAT 及 MDA 试剂盒购自南京建成生物工程研究院。免疫组化二抗、DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,小鼠抗 β -actin 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,组织总蛋白抽提试剂盒、BCA 浓度测定试剂盒以及化学发光法(ECL)发光液为上海申能博彩产品,倒置相差显微镜为德国 Leica 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与模型建立 40 只 Wistar 大鼠被随机分为生理盐水组(Control 组)、SFP 对照组、

AGEs 组与 SFP 组,每组大鼠各 10 只;大鼠麻醉后固定于立体定向仪上,头部备皮消毒,在颅顶正中线位置切开,采用微量注射泵海马立体定向注射法^[5]; AGEs 组和 SFP 组大鼠双侧海马内分别注射 AGEs 5 μ L,造成 AGEs 海马损伤,Control 组和 SFP 对照组按照同样方法注射等量生理盐水作为海马损伤模型的空白对照;造模前 1 周以 5 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹ 给予 SFP 组和 SFP 对照组腹腔注射 SFP,连续给药 4 周,AGEs 组、Control 组则同时给予腹腔注射同样体积的生理盐水作为空白对照。

1.2.2 Morris 水迷宫实验 水迷宫为一圆形水池,平均分为 4 个象限,将平台置于第一象限的中央;造模 3 周后 5 d 开始水迷宫试验,前 4 d 为定向航行试验,在同一时间段内分别训练 4 次;训练开始前在水迷宫池壁分别标 4 个方向的入水点,将平台置于西南象限正中,向水池中注入牛奶并高于平台,然后把大鼠从 4 个入水点放进迷宫若干次,训练大鼠寻找水下的平台的能力;第 5 d 任意选择 1 个入水点把大鼠放入水池,记录其每次找到平台的时间即为逃避潜伏期(Escape latency, EL),并记录大鼠 60 s 内穿越平台的次数。

1.2.3 标本采集 水迷宫试验结束后 3% 苯巴比妥腹腔注射麻醉大鼠,剪开胸腔,从左心室灌入生理盐水的同时剪开右心耳,等清亮液体从右心耳流出,然后断头取脑,分离海马用液氮保存,用于抗氧化酶生化试剂盒、ELISA 以及 Western blot 检测。

1.2.4 SOD、GSH-Px、CAT 酶活性,MDA 水平检测 准确称取待测海马组织,按照重量体积比 1:9 加冰生理盐水制成 10% 海马组织匀浆,严格按照生化试剂盒说明书检测 SOD 活性、GSH-Px 酶活性、CAT 酶活性和 MDA 水平。其中 SOD 酶活性检测采用 WT-1 法,二硫代二硝基甲苯酸法检测 GSH-Px 酶活性,采用钼酸铵法检测 CAT 酶活性,硫代巴比妥酸法测定 MDA 水平。

1.2.5 Western 印迹及 ELISA 法检测 TNF- α 和 IL-1 β 表达水平 取冷冻好的海马组织提取蛋白,二喹啉甲酸(BCA)法测定提取蛋白浓度,将蛋白注入凝胶孔内,经聚丙烯酰胺凝胶电泳转移到聚偏乙烯(PVDF)膜上,然后采用封闭液封闭,10 mL 的一抗稀释液孵育,4℃ 过夜,第 2 d 采用 Tris 盐酸缓冲液(TBST)洗膜 3 次,然后加入到同辣根过氧化物酶

结合的二抗于室温下一起孵育 1 h;TBST 洗膜 3 次后将膜置于 X 线片与增感屏接触,照相和条带密度扫描采用 Alpha Imager 2000 凝胶图像分析系统(美国 Alpha innotech 公司产品),最后计算目的蛋白表达相对水平:相对系数 = 目的带表达强度/ β -actin 表达强度,从而半定量分析;应用 ELISA 试剂盒测定 IL-1 β 和 TNF- α 的水平,具体按说明书步骤操作;最后用分光光度计在 450 nm 波长下测吸光度(A) 值,绘制标准曲线,根据曲线计算炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 水平。

1.2.6 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件。计量资料采用随机区组设计单因素方差分析,数值采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物生存情况 实验过程中 AGEs 组大鼠死亡 2 只:1 只死于手术时出血过多可能造成的颅内压增高;1 只死于立体定向注射前麻醉过深;SFP 组大鼠死亡 1 只,死于麻醉过深,死亡大鼠分别给以相应的补充。

2.2 Morris 水迷宫实验 AGEs 组大鼠学习记忆能力显著降低,表现为试验第 5 d 逃避潜伏期较 Control 组显著延长($P < 0.01$),穿越平台次数明显减少($P < 0.01$),SFP 组较 AGEs 组逃避潜伏期明显减少($P < 0.05$),穿越平台次数增加($P < 0.01$)(图 1)。

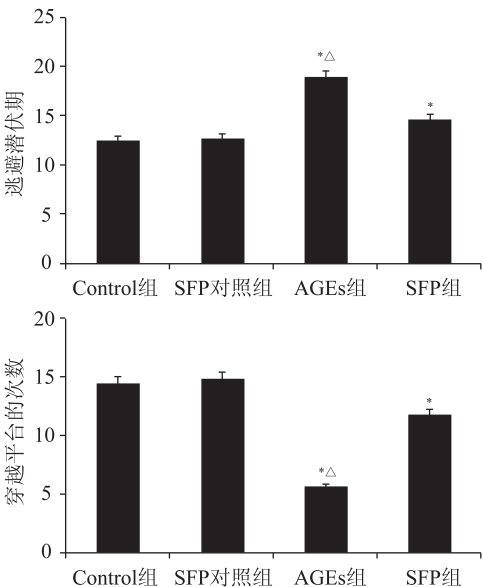


图 1 各组大鼠 Morris 水迷宫实验第 5 d 逃避潜伏期以及穿越平台的次数 与 Control 组比较,* $P < 0.01$;与 SFP 组比较, Δ $P < 0.05$

2.3 海马 SOD、GSH-Px、CAT 酶活性及 MDA 水平 与 Control 组比较,AGEs 组大鼠海马组织 SOD、GSH-Px、CAT 酶活性明显降低($P < 0.01$),而 MDA 水平显著升高($P < 0.01$);SFP 组较 AGEs 组 SOD、GSH-Px、CAT 酶活性显著升高($P < 0.05$),而 MDA 水平下降($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 各组大鼠海马组织 SOD、GSH-Px 及 CAT 酶活性及 MDA 水平

组别	SOD 酶活性 (U/mg prot)	GSH-Px 酶活性 (U/mg prot)	CAT 酶活性 (U/mg prot)	MDA 水平 (nmol/mg prot)
Control 组	67.56 \pm 3.55	50.23 \pm 2.81	2.75 \pm 0.45	2.38 \pm 0.53
SFP 对照组	64.35 \pm 5.28	48.19 \pm 4.33	2.37 \pm 0.31	2.17 \pm 0.33
AGEs 组	43.10 \pm 4.18 ^{*△}	30.21 \pm 4.12 ^{*△}	1.37 \pm 0.38 ^{*▲}	4.37 \pm 0.34 ^{*▲}
SFP 组	56.42 \pm 3.55 [*]	39.17 \pm 3.87	1.80 \pm 0.68 [*]	2.89 \pm 0.48 [*]

注:与 Control 组比较,* $P < 0.01$;与 SFP 组比较, Δ $P < 0.05$, \blacktriangle $P < 0.01$

2.4 ELISA 法检测海马炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达水平 AGEs 组 TNF- α 及 IL-1 β 表达水平较 Control 组显著升高($P < 0.01$),SFP 组 TNF- α 及 IL-1 β 表达水平较 AGEs 组显著降低($P < 0.01$)(图 2)。

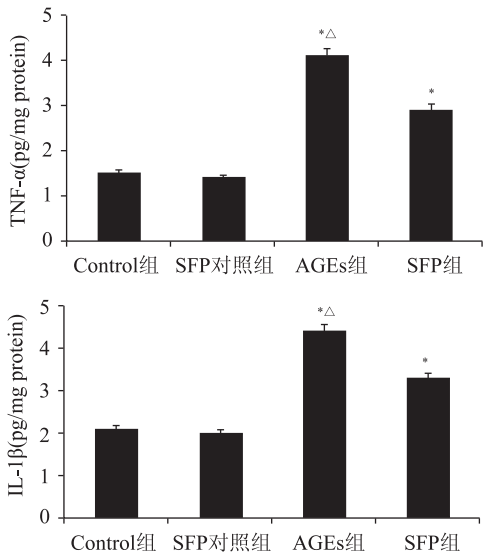


图 2 ELISA 法检测各组大鼠海马组织 TNF- α 及 IL-1 β 的表达水平 与 Control 组比较,* $P < 0.01$;与 SFP 组比较, Δ $P < 0.05$

2.5 Western blot 检测大鼠海马组织 TNF- α 及 IL-1 β 表达水平 AGEs 组 TNF- α 及 IL-1 β 表达水平较 Control 组显著升高($P < 0.01$),SFP 组 TNF- α 及 IL-1 β 表达水平较 AGEs 组显著降低($P < 0.01$)(图 3)。

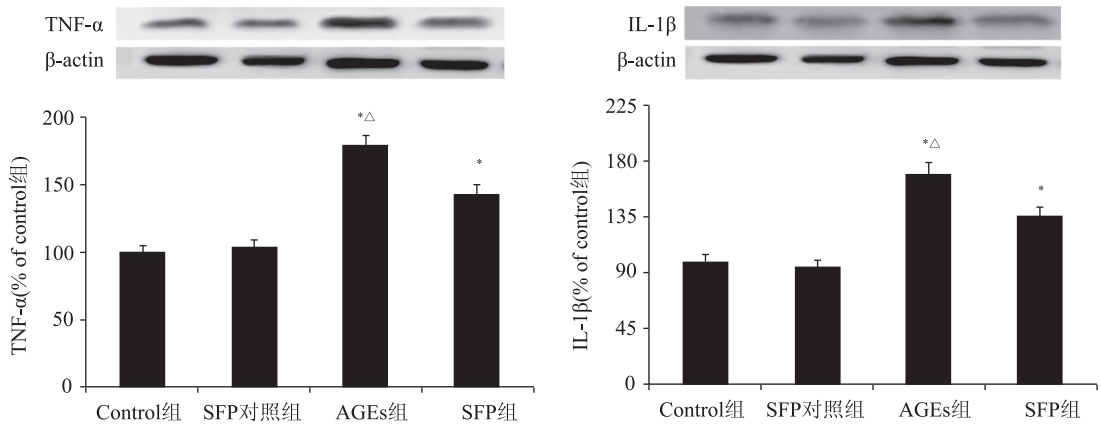


图3 Western blot 法检测各组大鼠海马组织 TNF- α 及 IL-1 β 的表达水平 与 Control 组比较, * $P < 0.01$; 与 SFP 组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

随着社会发展,高糖、高脂等西方饮食越来越多被人们食用,而西方饮食富含糖基化终末产物(AGEs)与人类健康密切相关,故研究 AGEs 对人体的危害及防治具有重要意义。AGEs 随个体年龄的增长在体内不断累积,可以引起许多毒性反应,AGEs 直接修饰蛋白质、脂肪以及氨基酸,可改变其结构与功能,还可以与其受体(receptor for AGEs, RAGE)结合,激活下游信号传导通路,引起氧化应激和促炎症反应的产生,促进阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、糖尿病神经病变、肾脏病变等诸多并发症的发生发展^[5-6]。

Morris 水迷宫实验是当前应用最为广泛的一种评估啮齿类动物学习和记忆能力的实验方法^[7]。根据 Morris 水迷宫实验结果,发现本研究所采用的 Nrf2 激动剂莱菔硫烷(SFP)具有增加认知能力的作用,具体表现为与 AGEs 组大鼠比较,逃避潜伏期(EL)和大鼠经过平台所在位置的次数分别显著缩短和增加,而 SFP 处理的大鼠则在实验过程中表现显著改善。以上结果表明 SFP 可以改善大鼠海马注射 AGEs 后受损的空间学习记忆能力。

有研究表明氧化应激是 AD 进展过程中的最早期事件^[8]。过量的 AGEs 在脑内蓄积,与 RAGE 结合后导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)等氧化产物的积聚,引起脑组织氧化损伤;ROS 产生可以诱导 IL-1 β 、IL-6 以及 TNF- α 等多种细胞炎症因子的表达^[9]。SOD、GSH-Px 及 CAT 等作为体内重要的抗氧化系统,可以有效地清除机体活性氧类和过氧化物的过度产生,也间接地反映了机体清除

氧自由基、保护机体免受氧自由基氧化损伤的能力。MDA 是体内脂质过氧化代谢产物,反映脂质过氧化的水平。AGEs 可以造成大鼠脑组织和 SH-SY5Y 细胞 SOD、GSH-Px、CAT 活性降低,MDA 水平增加^[10]。本实验结果亦表明,AGEs 海马注射可以造成大鼠海马内 SOD、GSH-Px 及 CAT 活性降低;Nrf2 激动剂 SFP 腹腔注射可以明显增加 SOD、GSH-Px 及 CAT 的活性,显著降低海马内 MDA 的水平。提示 Nrf2 激活在对 AGEs 造成的氧自由基生成和氧化应激中具有保护作用。IL-1 β 及 TNF- α 是重要的神经炎症因子之一,AGEs 可以引起大鼠脑组织内促炎症细胞因子 IL-1 β 及 TNF- α 表达水平增加,阻断 RAGE 可以改善 AGEs 诱导的炎症反应^[11]。本实验结果还表明 AGEs 海马注射可以引起 IL-1 β 及 TNF- α 表达水平较 Control 组明显增加,SFP 组炎症因子表达水平明显降低,提示 SFP 可以减轻海马内炎症反应。有研究表明,AGEs 与 RAGE 结合后激活神经胶质细胞及小胶质细胞内信号转导通路,诱导核转录因子 kappa B (nuclear transcription factor, NF- κ B) 表达,从而进一步上调多种炎症因子比如 IL-1 β 及 TNF- α 的产生;NF- κ B 还可以诱导氧自由基的生成^[12]。因此,氧自由基、炎症因子及其它炎症介质可导致神经元凋亡,进而引起 AD 等疾病的发生发展。未来将进一步探讨 Nrf2 在抗炎、抗氧化中可能存在的信号通路。

Nrf2 作为机体内源性抗氧化系统的关键调节蛋白,在氧化应激条件下可发生核转位,与抗氧化反应元件 ARE 结合,从而启动下游一系列抗氧化酶基因的转录,提高抗氧化酶表达水平,发挥抗氧化作

用。大量研究表明, Nrf2 诱导剂具有神经保护作用, 在 AD 等神经退行性疾病模型中能减缓氧化应激、减轻炎症反应。激活 Nrf2-ARE 通路而发挥神经保护作用越来越受研究者重视。SFP 是 Nrf2 通路的诱导剂, 在西兰花等十字花科蔬菜中大量存在, 大量研究表明 SFP 激活 Nrf2 的机制主要是改变 Keap1 半胱氨酸残基的构象, Nrf2 入核积累并激活下游抗氧化酶的转录; SFP 还能提高细胞内激酶活性, 从而使 Nrf2 磷酸化或调节 Nrf2 的活性^[13], 诱导 II 相酶的表达; 在糖尿病心肌病模型中 SFP 能上调 Nrf2 表达和下游 NQO1 和 HO-1 基因的转录^[14]; SFP 能逆转细胞凋亡, 降低 ROS 的产生, 增加 Nrf2 和下游 HO-1 等抗氧化酶的表达水平。此外, 在肾功能障碍、肝纤维化和肿瘤等模型中 SFP 能减缓氧化应激, 改善炎症反应。临床研究显示, 口服 SFP 能增加上呼吸道中抗氧化酶的表达水平, 如 NQO1、HO-1、GSTM1 和 GSTP1 等^[16]。

本研究通过建立 AGEs 海马损伤大鼠模型, 并采用 Nrf2 激动剂 SFP 干预, 发现 SFP 可以显著改善大鼠学习记忆功能, 减缓海马内氧化应激和炎症反应, 揭示了 Nrf2 在神经保护作用中的可能机制。随着 Nrf2 激活对脑损伤的保护作用及其机制的深入研究, Nrf2 或可成为 AD 等神经退行疾病防治的关键靶点。我们将进一步探讨 Nrf2 激活对神经保护作用的信号转导通路, 为其应用于神经退行性疾病的治疗提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Srikanth V, Maczurek A, Phan T, et al. Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2011, 32(5): 763-777.
- [2] Yan Fang, Barile R, D'agati Vivette, et al. The biology of RAGE and its ligands: uncovering mechanisms at the heart of diabetes and its complications[J]. *Curr Diab Rep*, 2007, 7(2): 146-153.
- [3] Corbett M, Bogers WM, Heeney JL, et al. Aerosol immunization with NYVAC and MVA vectored vaccines is safe, simple, and immunogenic[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(6): 2046-2051.
- [4] Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases [J]. *Nature*, 2006, 443(7113): 787-795.
- [5] Chen Xi, Walker G, Schmidt Marie, et al. RAGE: a potential target for Aβ-mediated cellular perturbation in Alzheimer's disease[J]. *Curr Mol Med*, 2007, 7(8): 735-742.
- [6] Bierhaus Angelika, Humpert M, Morcos Michael, et al. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2005, 83(11): 876-886.
- [7] Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat[J]. *J Neurosci Methods*, 1984, 11(1): 47-60.
- [8] Cai Z, Zhao B and ratka a[J]. Oxidative stress and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*, 2011, 13: 223-250.
- [9] Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, et al. Oxidative stress in Alzheimer's disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1502(1): 139-144.
- [10] Yin Qing, Dong Fang, Dong Qin, et al. AGEs induce cell death via oxidative and endoplasmic reticulum stresses in both human SH-SY5Y neuroblastoma cells and rat cortical neurons[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2012, 32(8): 1299-1309.
- [11] Hong Yan, Shen Chao, Yin Qingqing, et al. Effects of RAGE-Specific inhibitor FPS-ZM1 on amyloid-β metabolism and AGEs-Induced inflammation and oxidative stress in rat hippocampus[J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(5): 1192-1199.
- [12] Mecocci P, Mariani E, Polidori MC, et al. Antioxidant agents in Alzheimer's disease [J]. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 2008, 8(1): 48-63.
- [13] Keum Sam. Regulation of the Keap1/Nrf2 system by chemopreventive sulforaphane: implications of posttranslational modifications[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2011, 1229(1): 184-189.
- [14] Zhang Zhiguo, Wang Shudong, Zhou Shanshan, et al. Sulforaphane prevents the development of cardiomyopathy in type 2 diabetic mice probably by reversing oxidative stress-induced inhibition of LKB1/AMPK pathway [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 77(5): 42-52.
- [15] Lin Hao, Wei Bo, Li Guangsheng, et al. Sulforaphane reverses glucocorticoid-induced apoptosis in osteoblastic cells through regulation of the Nrf2 pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2014, 8(2): 973-982.
- [16] Riedl A, Saxon Andrew, Diaz-Sanchez David. Oral sulforaphane increases Phase II antioxidant enzymes in the human upper airway [J]. *Clin Immunol*, 2009, 130(3): 244-251.

(2016-12-21 收稿)