

# 丁苯酞通过调控 Nrf2 通路来改善脑小血管病的认知功能障碍

余静 史颖颖 卢祖能 尹皓

**【摘要】 目的** 探索丁苯酞通过调控核因子 e2(Nuclear factor erythroid-2, NF-E2)相关的转录因子(Related factor 2, Nrf2)信号通路来改善脑小血管病的认知功能障碍。**方法** 成功建立脑小血管病(Cerebral small vascular disease, CSVD)SD 大鼠模型,将成功建立的脑小血管病大鼠模型随机分为空白组、模型组及治疗组,比较 3 组大鼠水迷宫实验行为学表现,检测 3 组大鼠脑组织 Nrf2 蛋白的水平。**结果** 模型组大鼠在水迷宫实验中穿越平台次数明显减少( $P<0.05$ ),治疗组能明显改善其穿越平台次数( $P<0.05$ )。Western blot 显示模型组 Nrf2 蛋白的水平明显低于空白组( $P<0.05$ ),而治疗组明显得到改善( $P<0.05$ )。**结论** 丁苯酞通过调控 Nrf2 信号通路来改善脑小血管病大鼠模型的认知功能障碍。

**【关键词】** 丁苯酞 Nrf2 脑小血管病 认知功能障碍

**【中图分类号】** R743 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2024)06-0537-04

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2024.06.005

**DL-3-N-butylphthalide can improve cognitive impairment in cerebral small vascular disease by regulating Nrf2 pathway** Yu Jing\*, Shi Yingying, Lu Zuneng, et al. \* Department of Medical Laboratory, Huangpi District People's Hospital Affiliated to Jiangnan University or Wuhan Huangpi District People's Hospital, Wuhan 430300

**【Abstract】 Objective** To explore the effect of butylphthalide on cognitive impairment in cerebral small vascular disease by regulating Nrf2 signaling pathway that is related to nuclear factor erythroid-2 (NF-E2). **Methods** Mouse models of cerebral small vascular disease were established successfully and randomly divided into blank group, model group and treatment group. The behavior data of water maze experiment were compared among the three groups. The levels of Nrf2 protein in brain tissue of three groups of mice were detected. **Results** In the water maze experiment, the times of crossing the platform were significantly reduced in the model group ( $P<0.05$ ), and the times of crossing the platform was significantly improved in the treatment group ( $P<0.05$ ). Western blot detection of Nrf2 protein changes in the brain tissues of the three groups of mice and indicated that Nrf2 in the model group was significantly lower than that in the blank group ( $P<0.05$ ), while Nrf2 in the experimental group was significantly improved ( $P<0.05$ ). **Conclusion** DL-3-N-butylphthalide can improve cognitive impairment in small cerebral vascular disease by regulating Nrf2 signaling pathway.

**【Key words】** DL-3-N-butylphthalide Nrf2 Cerebral small vascular disease Cognitive impairment

脑小血管病是一种慢性进行性疾病,主要累及脑白质和灰质深部结构的微小动脉、微血管和小静脉。该疾病的临床分类目前主要通过影像学诊断,主要影响颅内直径为 50~400  $\mu\text{m}$  的小血管,且会导致皮层下脑白质的损害<sup>[1]</sup>。脑小血管病占有脑

卒中的 20%~25%,症状主要表现为认知功能下降、情感异常、步态障碍和尿失禁等<sup>[2]</sup>。脑小血管病起病隐匿,早期诊断率低,治疗效果差,对患者的生活质量造成严重影响,给家庭和社会带来沉重负担。

尽管关于脑小血管病的病因尚无明确解释<sup>[3]</sup>。但当前可能是由多种风险要素如基因、环境等综合影响所致的脑小血管病。有报道提示,慢性的炎症状况可能会引发神经系统的病变并成为该类疾病的诱发条件<sup>[4]</sup>;另一方面,过度的氧自由基生成被认为是一种主要造成中枢神经组织受损的原因,而这已

基金项目:武汉市中医药科研项目(WZ24Z14)

作者单位:430300 武汉市黄陂区人民医院检验科(余静),神经内科[尹皓(通信作者)];江汉大学医学部(史颖颖);武汉大学人民医院神经内科(卢祖能)

被证实为涉及到脑小血管病的发生进程中<sup>[5]</sup>。同时值得注意的是,当人体受到过度刺激时会启动自身的防御体系以抵消这种伤害效应,使得整体保持稳定的状态。NF-E2 相关的转录因子(Nrf2)在此过程中起到核心角色:它能同抗氧化反应元件(Antioxidant response element, ARE)的特定区域结合起来控制合成对抗有害物质侵害的有益蛋白质—包括血红素氧合酶 1(Heme Oxygenase-1, HO-1)及 Nrf2 本身的存在<sup>[6]</sup>。因此,需要进一步探讨这个路径对这类病例的影响程度及其具体的作用方式。

目前临床上丁苯酞主要应用于急性脑梗死,旨在改善急性脑梗死患者的脑血流量,缩小梗死灶面积,使得患者病情得到好转。有关使用丁苯酞来处理非痴呆型的血管性认知障碍的实验已经进行了报道<sup>[7]</sup>,并且其效果被证实可以提升患者的大脑及身体的功能表现且有着优秀的安稳度与接受率。另外,也有研究表明其结合艾地苯酮时,它能有效地降低患有血管性的老年痴呆症的患者血液中的炎性物质水平、调整他们的动脉壁细胞的活动情况以减缓他们大脑退化的情况同时也能提高记忆力和生活自理的能力<sup>[8]</sup>。其中 Nrf2 路径作为一种核心机制参与到身体的抗氧化反应,而且它的作用也被证明。最新研究表明,丁苯酞可通过 Nrf2/沉默信息调节因子 2 相关酶 3(Silent mating type information regulation2 homolog-3, SIRT3)通路在血管性痴呆小鼠模型中给予神经保护治疗<sup>[9]</sup>,那么丁苯酞是否通过 Nrf2 通路来改善脑小血管病的认知功能障碍?

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 采用一批健康的、年龄为 7~8 周的 SD 大鼠作为试验对象,这些大鼠来自武汉大学 AⅢ实验室。它们被安置在 1 个恒温的环境中,保持在 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$ 的温度下,并有相对稳定的湿度控制在 $(55 \pm 5)\%$ ,同时实行了 12 h 的光照与黑暗循环模式,让它们可以随意地摄取食物和水源。在此之前的 1 周里将其进行了适应性的喂养以确保它们的状态良好。整个实验过程都遵循了《实验动物饲养和使用条例》的规定。

1.1.2 主要试剂 丁苯酞软胶囊;恩必普(butylphthalide, NBP)来自石药控股集团有限公司,生产批号为 1182310120;Nrf2 抗体来自 Abcam 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 分组及建模 给大鼠注射 10%水合氯醛进行腹腔麻醉,并将其固定在仰卧位的固定板上;剃完颈部毛发后用剪刀剪颈部中部;接着,将两侧的颈总动脉分离,然后用动脉止血钳进行夹紧;随后阻断血流 20 min,随后尾部放血;松开动脉钳,恢复血流 10 min;用动脉钳再次夹紧动脉,使血流停止 20 min;重复 3 次,观察大鼠的呼吸和心跳。若上述指标正常,则用庆大霉素消毒后缝合皮肤,保存温度;在完全覆盖后将大鼠放回笼子喂养。所有的大鼠都成功地完成了模型构建。根据设计的 NBP 用量对治疗组进行了 ig 给药处理( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),这个剂量是基于 NBP 的使用者指南中所述的患者用药量,并通过以患者体重 60 kg 作为基准来推算得到的日均每公斤药物使用量。从研究启动的第 1 d 起(即 d1)就开始了静脉给药过程,持续 2 周之后执行了 Morris 水迷宫试验。在大鼠死亡时结束研究,然后提取其脑部皮质区域样本,经过固定、石蜡封存后制作成腊块样品,用于进一步的研究工作。

1.2.2 Morris 水迷宫实验 实验维持了水迷宫的水温为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ ,并从每日早上 10 点开始执行定位航行任务;所有定位航行测试结束后等待 24 h 再进行空间探测实验;在此期间将平台移动到其对角线位置,使大鼠进入水中并在该区域游动 60 s,然后记录它们的运动轨迹,统计它们经过原始平台的频率及停留在原始平台区间的比例;这个过程会持续 5 d,之后会有 1 周的休整时间,然后再重新做 1 次定位航行实验。

1.2.3 取材 对每个小组的大鼠实施随机分配,将其分为两部分,每一部分包含 5 只大鼠,使用 3%的戊巴比妥钠通过腹腔注射来使它们昏迷。第一批次的大鼠会直接打开头部获取其大脑半球的海马组织,将其切成小碎片并放入已做标识的冷冻储存管中,以液态氮为媒介进行冷藏,以便后续 Western blot 等实验所需;第二批次的大鼠则会在被注入了 4%的多聚甲醛之后再提取其脑部,并在剥离出脑组织后立即将其放在含有 10%福尔马林的环境下保持在 $4^\circ\text{C}$ 的冰箱里进行后期处理,这个过程需要超过 2 h,最后形成腊制切片。

1.2.4 Western blot 对大鼠大脑组织的 Nrf2 蛋白质的表达水平进行了检测。首先从脑组织中获取样本并将其研磨成粉末状,然后用蛋白抽提液来分离出所有的蛋白质;接着,利用聚氨基丙烯酸正丁酯(Bicinchoninic acid, BCA)蛋白含量测试套装对这

些蛋白质的水平进行了测量;最后,通过 Western blot 技术分析了大鼠大脑中的 Nrf2 蛋白质的表达水平。

1.2.5 统计学处理 使用 SPSS 22 软件,计算各组数据的平均值和标准差,然后通过 One-Way ANOVA 方法比较各组实验数据之间的差异。当  $P<0.05$  为差异具有显著性。

2 结果

2.1 脑小血管病模型建立

在造模后的第 5 d 对各组大鼠进行了穿越平台行为学评分比较见图 1。与空白组比较,模型组大鼠穿越平台的次数显著减少( $P<0.05$ );与模型组比较,NBP 组大鼠穿越平台的次数明显增加( $P<0.05$ )。即大鼠脑小血管病(Cerebral small vascular disease,CSVD)模型成功建立,NBP 可改善其认知功能障碍。

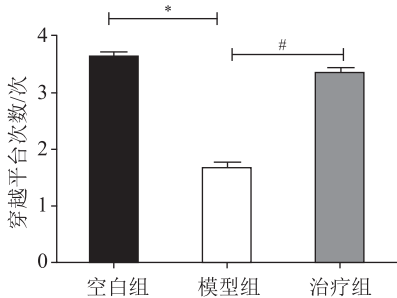


图 1 3 组在水迷宫实验 与空白组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,# $P<0.05$

2.2 Morris 水迷宫实验

经过训练后空白组的大鼠和治疗组的大鼠穿越平台的次数比模型组显著增多,而模型组的穿越平台次数和占比显著减少(图 1)。值得注意的是,治疗组的穿越平台次数比模型组增加(图 2)。

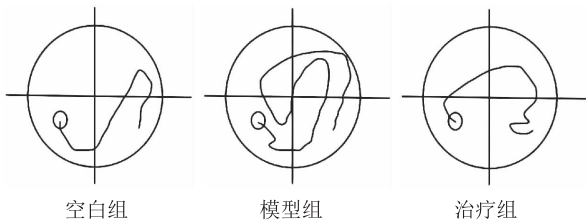


图 2 CSVD 模型建立,且 3 组小鼠 Morris 水迷宫轨迹

2.3 丁苯酞可以通过 Nrf2 来改善 CSVD 的认知功能障碍

丁苯酞能改善 CSVD 模型大鼠的认知功能障

碍(图 1~2),且丁苯酞能明显增高 Nrf2 蛋白的相对表达水平( $P<0.05$ )(图 3)。

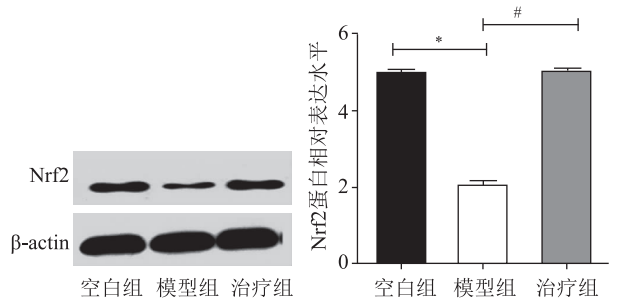


图 3 丁苯酞能明显增加 Nrf2 蛋白的表达 与空白组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,# $P<0.05$

3 讨论

目前还没有特效疗法可以针对脑小血管病。当前对于其预防和治疗策略主要是针对脑微血管内皮和血脑屏障、微血管功能和神经炎症等方面。我们需要对所有 CSVD 患者进行评估以确定是否存在高血压病、糖尿病、高脂血症和吸烟等常见血管危险因素。对于 CSVD 患者引起的认知功能障碍更加增加了患者及家庭负担,临床上围绕这个问题提出了很多令人深思的解决办法。

Yan Haiqing 等<sup>[10]</sup>人在 2017 年就已经表明,丁苯酞能够显著提升急性脑梗死患者的认知功能水平;与对照组比较,它可以明显地增强他们的整体认知表现,并且在名称识别、记忆力、注意力以及言语技能等方面也有明显的进步。另外,在 2018 年 Wang Hongtao 等<sup>[11]</sup>人的研究通过 Meta 分析揭示丁苯酞对血管性认知功能障碍患者具有良好的治疗效果和安全性,这进一步验证了它的功效和安稳性都相当优秀。2021 年 Xueming Fan 等<sup>[12]</sup>人同样证实了丁苯酞能改善脑卒中后认知功能障碍(Post-stroke cognitive impairment, PSCI)患者的认知功能和日常生活能力。Qiulu Zhou 等<sup>[14]</sup>人也证实了丁苯酞对改善认知功能障碍有着积极作用。但针对其机制研究相对较少。

Yang 等<sup>[15]</sup>人指出丁苯酞通过磷脂酰肌醇-3-激酶(Phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(Protein kinase B, Akt)信号通路来阻止 CSVD 细胞凋亡过程。有文献提及了丁苯酞能够优化患有 CSVD 的大鼠大脑组织的细胞结构并提升它们的学习和记忆功能,同时也能减缓神经元死亡的过程。此外,该药物的可能作用原理被认为是通过激活

PI3K/Akt 信号途径来实现的。然而,牟肖莉等<sup>[16]</sup>人的研究表明,他们试图探究丁苯酞如何影响糖尿病脑小血管病大鼠的生物学反应时并未得到预期的阳性结果。本研究认为其实验大鼠模型建立失败,导致其最终实验结果为阴性。

本研究从实验思路上选择颈动脉结扎建立有效的 CSVD 大鼠动物模型,基于此模型进行 Nrf2 信号通路研究,且证实其实验结果阳性。本研究得出丁苯酞能通过 Nrf2 信号通路来改善 CSVD 的认知功能障碍;同时相较于 PI3K/Akt 信号途径,Nrf2 被认为更具优势,能够有效地抵御氧化损伤并保护神经系统<sup>[15]</sup>。有研究发现,通过激活 Nrf2 可以减轻阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)模型小鼠认知功能缺陷,同时也能降低氧化压力和神经炎性反应<sup>[17-18]</sup>。本研究认为本实验能为丁苯酞治疗 SCVD 的认知功能障碍提供更好的理论基础,期待后续更进一步研究。

参 考 文 献

[1] 中华医学会神经病学分会. 中国脑小血管病诊治专家共识[J]. 中国卒中杂志, 2021, 16(7): 716-726.

[2] Brisset M, Boutouyrie P, Pico F, et al. Large-vessel correlates of cerebral small-vessel disease[J]. Neurology, 2013, 80(7): 662-669.

[3] 张在强, 王拥军. 脑小血管病基础研究的争议与启示[J]. 中国卒中杂志, 2013, 8(6): 423-425.

[4] Pantoni L. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges[J]. Lancet Neurol, 2010, 9(7): 689-701.

[5] 徐亚丽, 姚莉, 何小蓉, 等. 老年血管性痴呆患者血清 C 反应蛋白及白介素 6 检测分析[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2018, 21(12): 1334-1337.

[6] 潘晓帆, 徐运. 氧化应激与缺血性卒中[J]. 国际脑血管病杂志, 2010, 18(3): 231-235.

[7] Yu X, Kensler T. Nrf2 as a target for cancer chemoprevention[J]. Mutat Res, 2005, 591(1/2): 93-102.

[8] Jia JP, Wei CB, Liang JH, et al. The effects of DL-3-n-butylphthalide in patients with vascular cognitive impairment without dementia caused by subcortical ischemic small vessel disease: a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Alzheimers Dement, 2016, 12(2): 89-99.

[9] Qi FX, Hu Y, Kang LJ, et al. Effects of butylphthalide combined with idebenone on inflammatory cytokines and vascular endothelial functions of patients with vascular dementia[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2020, 30(1): 23-27.

[10] Gao LW, Guo X, Liu S, et al. DL-3-n-butylphthalide imparts neuroprotection via Nrf2/SIRT3 pathway in a mouse model of vascular dementia[J]. Brain Res, 2022, 1779: 147785.

[11] Yan HQ, Yan ZX, Niu XL, et al. DL-3-n-butylphthalide can improve the cognitive function of patients with acute ischemic stroke: a prospective intervention study[J]. Neurol Res, 2017, 39(4): 337-343.

[12] 卫红涛, 吴汀溪, 李丹丹, 等. 丁苯酞用于血管性认知功能障碍患者有效性与安全性 Meta 分析[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(8): 859-864.

[13] Fan X, Swlye M. Safety of DL-3-n-Butylphthalide in the treatment of poststroke cognitive impairment: a systematic review, meta-analysis M. Front pharmacol[Z], 2022: 810297.

[14] Zhou Q, Han C, Xia Y, et al. Efficacy and safety of 3-n-butylphthalide for the treatment of cognitive impairment: a systematic review and meta-analysis[J]. CNS Neurosci Ther, 2022, 8(11): 1706-1717.

[15] Qi YY, Feng XF, Qiu L, et al. 3-n-butylphthalide inhibits the apoptosis of nerve cells in rats with cerebral small vessel disease via the PI3K/Akt pathway. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(10): 4474-4480.

[16] 牟肖莉, 王波, 赵娟, 等. 基于核因子 NF-E2 相关因子/血红素氧合酶-1 信号通路研究丁苯酞对糖尿病脑小血管病大鼠的作用机制[J]. 中国新药杂志, 2023, 32(14): 1467-1471.

[17] Wang CY, Wang ZY, Xie JW, et al. DL-3-n-butylphthalide-induced upregulation of antioxidant defense is involved in the enhancement of cross talk between CREB and Nrf2 in an Alzheimer's disease mouse model[J]. Neurobiol Aging, 2016, 38: 32-46.

[18] Uruno A, Matsumaru D, Ryoke R, et al. Nrf2 suppresses oxidative stress and inflammation in App knock-in Alzheimer's disease model mice[J]. Mol Cell Biol, 2020, 40(6): e00467-19.

(2024-05-06 收稿)

• 消 息 •

声 明

本刊版权归武汉大学人民医院所有。除非特别声明,本刊刊出的所有文章不代表《卒中与神经疾病》编辑委员会的观点。  
本刊已入编“万方数据·数字化期刊群”、“中国核心期刊(遴选)数据库”及“中国知网”等。作者如不同意将文章入编投稿时敬请说明。