

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2024.03.001

❖ 基础研究 ❖

丁苯酞对小鼠颅脑损伤后认知功能的保护作用

牛文书¹, 张振红¹, 王玉斌¹, 李经纶², 刘扬¹

(联勤保障部队第九八八医院, 1. 神经内科; 2. 神经外科, 河南 郑州 450000)

【摘要】目的: 观察丁苯酞对小鼠颅脑损伤(TBI)后认知功能的保护作用。**方法:** 将 120 只雄性昆明小鼠随机分为假手术组、手术对照组、丁苯酞处理组 1 和丁苯酞处理组 2。采用压缩损伤法建立 TBI 模型, 丁苯酞处理组 1 给予 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 丁苯酞腹腔内注射, 丁苯酞处理组 2 和假手术组给予 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 丁苯酞, 手术对照组给予同等剂量的生理盐水。采用 Morris 水迷宫和 Y 型迷宫行为学测试评估小鼠空间认知功能, 免疫印迹法检测海马和前额叶内侧皮质 BDNF 表达水平, TUNEL 检测海马区神经元凋亡。**结果:** 与手术对照组比较, TBI 后 7 d 及 14 d, 丁苯酞处理组 2 小鼠自发交替行为增多 ($P < 0.05$); TBI 后 14 d, 丁苯酞处理组 1 和组 2 逃避潜伏期缩短 ($P < 0.05$); TBI 后 28 d, 丁苯酞处理组 2 小鼠逃避潜伏期缩短 ($P < 0.05$); TBI 后 14 d, 丁苯酞处理组 1 海马组织与丁苯酞处理组 2 海马组织及前额叶内侧皮质 BDNF 表达水平均上调 ($P < 0.05$)。各组海马区神经元凋亡率比较: 假手术组 < 丁苯酞处理组 2 < 丁苯酞处理组 1 < 手术对照组 ($P < 0.05$)。**结论:** 丁苯酞可改善小鼠 TBI 后空间记忆功能, 上调海马及前额叶内侧皮质 BDNF 表达与抑制海马神经元的凋亡可能是其潜在机制。

【关键词】 脑损伤模型; 小鼠; 丁苯酞; 神经保护

【中图分类号】 R641; R338.1

【文献标志码】 A

Protective effect of dl-3n-butylphthalide on cognitive function after traumatic brain injury in mice

NIU Wen-shu¹, ZHANG Zhen-hong¹, WANG Yu-bin¹, LI Jing-lun², LIU Yang¹

(1. Department of Neurology; 2. Department of Neurosurgery, No. 988 Hospital of PLA, Zhengzhou 450000, Henan, China)

【Abstract】Objective: To investigate the protective effect of dl-3n-butylphthalide on cognitive impairment after traumatic brain injury (TBI) in mice. **Methods:** 120 male Kunming mice were randomly divided into the sham operation group, the operation control group, the dl-3n-butylphthalide treatment group 1 and group 2. The TBI model was established by compression damage. The dl-3n-butylphthalide treatment group 1 was treated with intraperitoneal injection of 100 mg/kg/d, group 2 and sham operation group were given 200 mg/kg/d of dl-3n-butylphthalide, while the operation control group was given the same dose of normal saline. The neurobehavioral changes were evaluated by Morris water maze test (MWM) and Y-maze tests. The expression of BDNF in hippocampus and medial prefrontal cortex was assessed by Western-blot, and neuronal apoptosis in the hippocampus was detected by TUNEL. **Results:** Compared with the operation control group, mice showed increased spontaneous alternation behaviors in dl-3n-butylphthalide treatment group 2 1 week and 2 weeks after TBI. Mice in the two dl-3n-butylphthalide treated groups showed shorter escape latency 2 weeks after TBI, and only mice in dl-3n-butylphthalide treatment group 2 showed shorter escape latency 4 weeks after TBI. Compared with the operation control group, the expression of BDNF in the dl-3n-butylphthalide treatment group 1 and group 2 were upregulated. The neuronal apoptosis rate in the hippocampus increased in sequence from the sham operation group, the dl-3n-butylphthalide treatment group 2, the dl-3n-butylphthalide treatment group 1 to the operation control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Dl-3n-butylphthalide can improve spatial memory function in mice after TBI. The effects of upregulating BDNF expression and inhibiting hippocampal neuron apoptosis may be among the potential mechanisms.

【Key words】 Traumatic brain injury model; Mouse; Dl-3n-butylphthalide; Neuroprotection

外伤性颅脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 会造成感觉、认知、行为、运动等功能损害, 是 45 岁以下人群致死、致残的重要病因之一^[1]。TBI 后神经功能障碍可由直接和间接的机械损伤及合并的脑出

血、缺血、水肿引起, 也可由继发的生化和病理生理层面的级联反应引起^[2-3]。除手术、康复锻炼外, 有效的脑保护药物也是治疗颅脑损伤的策略之一。丁苯酞是我国自主研发的脑血管领域新药, 具有抗炎、

基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (LHGJ20190883)

作者简介: 牛文书 (1973 -), 女, 副主任医师。E-mail: sean_jr@163.com

通讯作者: 刘扬。E-mail: teen_4ever@126.com

抗氧化、减轻神经细胞损伤、促进神经功能恢复等作用^[4]。丁苯酞目前已被证实可改善大脑认知功能,在急性脑梗死、血管性痴呆等疾病中显示了良好的临床效果^[5]。有研究^[6]报道丁苯酞能改善 TBI 小鼠的神经功能评分,但目前对丁苯酞在 TBI 后认知障碍的应用报道较少。基于此,本研究拟通过构建小鼠急性 TBI 模型,旨在初步探讨丁苯酞对脑外伤后认知障碍的保护作用及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级健康雄性昆明小鼠 40 只,由郑州大学实验动物中心提供,7~8 周龄,体重(27 ± 2.1)g。饲养条件:光照时间 12 h,室温 20~22℃,湿度 50%~60%,给予充足无菌水及饲料喂养,适应性喂养 7 d。实验经本院实验动物伦理委员会批准,实验过程符合国家和单位有关实验动物的管理和使用规定。

1.2 主要实验仪器和试剂

丁苯酞氯化钠注射液(石药集团恩必普药业有限公司);抗小鼠脑衍生神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)抗体(美国 Abcam);抗小鼠 GAPDH 抗体(美国 Abcam);BCA 试剂盒(上海碧云天),TUNEL 反应试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司);DP71 型荧光显微镜(日本奥林巴斯株式会社);成像系统(加拿大 QImaging 公司),Morris 水迷宫系统(北京友诚嘉业生物科技有限公司);凝胶成像分析系统(美国 BioRAD)等。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制备及分组 将小鼠随机分为假手术组、手术对照组、丁苯酞处理组 1 和组 2,每组各 10 只。小鼠适应性喂养 7 d 后,手术对照组、丁苯酞处理组 1 和组 2 采用压缩损伤法诱导颅脑损伤。小鼠经 0.3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后固定于鼠板上,备皮消毒,沿颅中线切开头皮并暴露顶骨,在左顶部用牙科钻研磨一直径约为 4 mm 的骨窗,仅保留薄层颅骨。将小鼠固定于脑立体定位仪上,脑立体定位仪纵轴连接一钝端直径为 3 mm 的无菌损伤器械,以前囟后 1.8 mm、中线旁 2 mm 为中心,缓慢旋转脑立体定位仪纵轴,使骨面与损伤器械钝端接触后向下按压 1.3 mm,导致颅骨向内塌陷压缩脑组织。打击结束后清洁创面,用骨蜡封闭骨窗,逐层缝合头皮,放回鼠笼。假手术组仅磨薄颅骨,不造成脑压缩损伤,其余步骤一致。

1.3.2 实验方法 以腹腔注射给药对小鼠进行干预。假手术组给予 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 丁苯酞处理;丁苯酞处理组 1 和组 2 分别给予 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、

$200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 丁苯酞处理;手术对照组给予同等剂量生理盐水处理。自开始造模前 1 d 每日固定时间给药,连续给药 15 d。

1.4 检测指标

1.4.1 神经行为学 (1)Y 型迷宫测试。于建模后 7 d、14 d 以 Y 型迷宫自发轮替行为测试。Y 型迷宫由 3 个不透光等长臂组成(长 30 cm,宽 8 cm,高 15 cm),相邻臂之间的角度为 120°。小鼠初始置于迷宫的中心位置,并允许自由探索 3 个臂 10 min。自发轮替行为定义为大鼠依次连续进入 3 个不同臂为 1 次。最大轮替次数 = 自发轮替次数 - 2;自发轮替行为百分比 = 自发轮替次数/最大轮替次数 $\times 100\%$ 。动物自发轮替行为比例较高时被认为具有较好的空间工作记忆能力。(2)Morris 水迷宫测试:于建模后 14 d、28 d 行 Morris 水迷宫定位航行测试。将小鼠放置于 Morris 水迷宫系统(直径 90 cm、高 60 cm 的圆形不锈钢水池 + 深度为 30 cm 的无毒不透明液体)中,将圆形水池平均分为 4 个象限,在其中 1 个象限中央放置 1 个圆柱形隐藏平台,小鼠随机从水池的 4 个入水点头朝池壁入水,任其游泳,直到找到平台,小鼠找到平台的时间和轨迹由水池上方的摄像机记录,每次试验后将小鼠烘干并休息 20 min 后进行下一次实验;记录小鼠每次寻找平台的逃避潜伏期。

1.4.2 脑组织 BDNF 表达 造模后 14 d 行为学评估后,于麻醉下取小鼠脑组织,分离伤侧前额叶皮层和海马结构,按试剂盒操作流程提取蛋白液,BCA 法测定蛋白浓度并配平。行经 SDS-PAGE 电泳,并将蛋白转至 PVDF 膜。封闭抗体后,加入抗 BDNF、抗 GAPDH (1:500) 4℃ 孵育过夜孵育,漂洗后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:500)孵育 2 h。使用 ECL 化学发光底物显影。以假手术组 BDNF/GAPDH 灰度比为 1,计算其他各组条带相对灰度比。

1.4.3 海马区神经元凋亡 于建模后 7 d 麻醉小鼠后制备脑组织冰冻切片,采用 TUNEL 法进行检测。常规行脱蜡、复水和抗原修复处理,使用 TUNEL 试剂盒,PBST 溶液洗脱玻片(3 次、10 min/次),滴加核染色剂,室温下处理 5 min;PBST 溶液洗脱,滴加抗荧光衰减液 5 μL ,封片;荧光显微镜观察并拍照。

1.5 统计学分析

采用 SPSS24.0 软件进行数据分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较行单因素方差分析,组内比较行 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠神经行为学比较

在 Y 型迷宫试验中,与假手术组比较,手术对照组小鼠造模后 7~14 d 自发轮替行为百分比减少 ($P < 0.05$)。与手术对照组小鼠相比,丁苯酞处理组 1 小鼠在 7~14 d 时自发轮替行为百分比有一定上升,但差异无统计学意义;丁苯酞处理组 2 小鼠自发轮替行为百分比上升,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。两丁苯酞处理组间比较,组 2 小鼠 14 d 时自发轮替行为百分比高于组 1 ($P < 0.05$)。见图 1。

在 Morris 水迷宫试验中,与假手术组比较,手术对照组小鼠造模后 7~14 d 逃避潜伏时间延长 ($P < 0.05$)。与手术对照组小鼠相比,丁苯酞处理组 1 小鼠在 14 d 时逃避潜伏时间延长 ($P < 0.05$),但在 28 d 时差异无统计学意义 ($P > 0.05$);丁苯酞处理组 2 小鼠在 14 d 及 28 d 时均低于手术对照组 ($P < 0.05$)。见图 2。

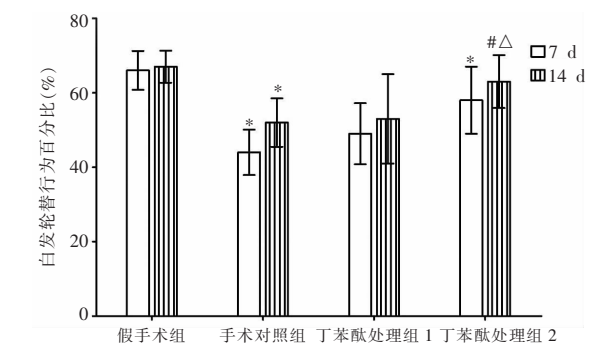


图 1 各组小鼠 Y 型迷宫试验自发轮替行为比较

* $P < 0.05$,与假手术组比较;# $P < 0.05$,与手术对照组比较;
Δ $P < 0.05$,与丁苯酞处理组 1 比较。

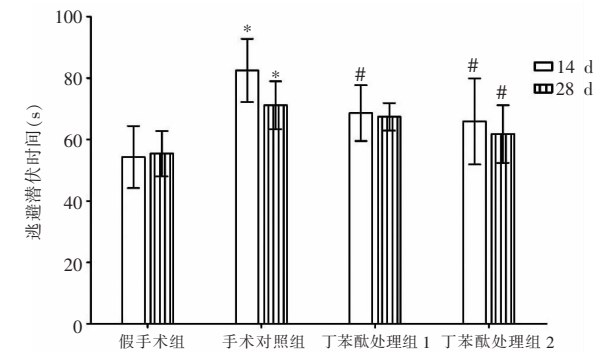


图 2 各组小鼠 Morris 水迷宫定位航行测试逃避潜伏期比较

* $P < 0.05$,与假手术组比较;# $P < 0.05$,与手术对照组比较。

2.2 各组小鼠海马和前额叶内侧皮质 BDNF 表达比较

TBI 后 14 d,小鼠海马及额叶前内侧皮质均下调 ($P < 0.05$)。与手术对照组相比,丁苯酞处理组 1 小鼠海马 BDNF 表达水平上调 ($P < 0.05$);丁苯酞处理组 2 小鼠海马及前额叶内侧皮质 BDNF 表达水

平上调 ($P < 0.05$)。两丁苯酞处理组间比较,组 2 小鼠前额叶内侧皮质 BDNF 上调高于组 1 ($P < 0.05$)。见图 3。

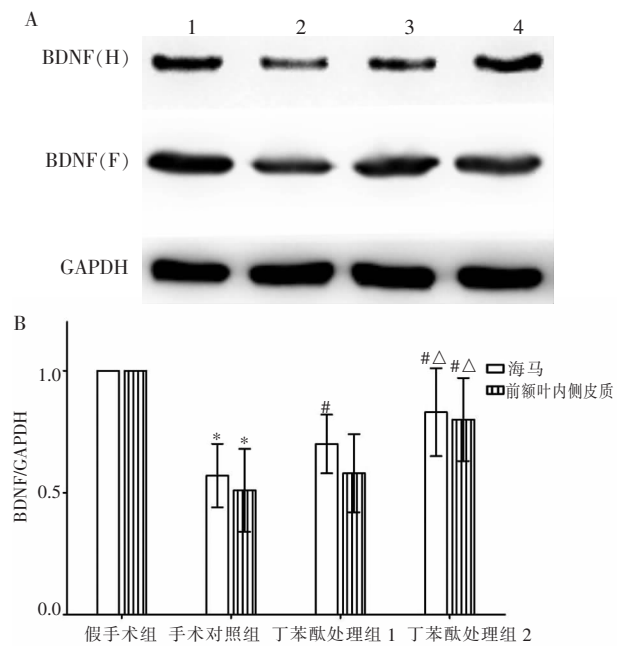


图 3 各组小鼠不同脑区 BDNF 表达比较。

A. TBI 后 14 d 海马(H)及前额叶内侧皮质(F)BDNF 表达水平比较,1.假手术组;2.手术对照组;3.丁苯酞处理组 1;4.丁苯酞处理组 2。B.BDNF/GAPDH 相对灰度值。* $P < 0.05$,与假手术组比较;# $P < 0.05$,与手术对照组比较;Δ $P < 0.05$,与丁苯酞处理组 1 比较。

2.3 各组小鼠海马区神经元凋亡情况比较

TBI 后 7 d,各组小鼠海马区神经元凋亡率比较:假手术组 < 丁苯酞处理组 2 < 丁苯酞处理组 1 < 手术对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。

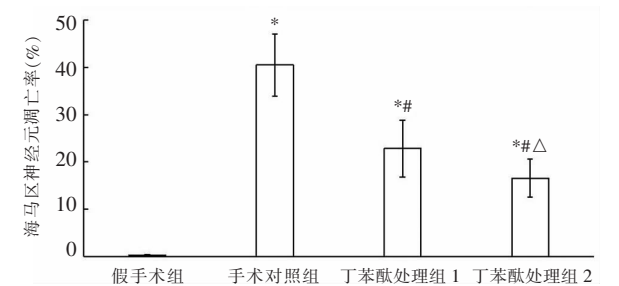


图 4 各组小鼠海马区神经元凋亡率比较

* $P < 0.05$,与假手术组比较;# $P < 0.05$,与手术对照组比较;
Δ $P < 0.05$,与丁苯酞处理组 1 比较。

3 讨论

颅脑损伤的发生与外部因素作用于脑组织造成的神经系统损伤有关,轻度颅脑损伤患者的神经功能可在短时间内恢复,但受临床症状不明显、影像学表现不典型、治疗延误等因素的影响,部分患者可能出现伤后远期神经退行性变和认知功能障碍,影响患者整体预后,需要引起更多的关注。

丁苯酞是指南^[7-8]推荐的神经保护剂,可通过

上调 NF-E2 相关因子 2 (Nrf-2)/血红素氧合酶 1 信号通路表达及其他多种机制,对脑损伤大鼠起到神经保护作用。本研究通过构建小鼠颅脑损伤模型,探讨了丁苯酞对脑外伤后认知障碍的保护作用。研究显示,实验小鼠脑组织在遭受外力打击后,出现明显的空间记忆功能损伤,表现为 Morris 水迷宫试验逃避潜伏时间延长和 Y 型迷宫试验自发轮替行为减少。丁苯酞干预对这些指标具有改善作用,并至少可持续至颅脑损伤后 28 d,提示其在脑外伤后急性期及亚急性期对认知功能受损具有保护作用。

据报道^[9]丁苯酞可靶向调控 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Keap-1),抑制 Keap-1 与 Nrf-2 的相互作用,激活细胞抗氧化活性,减轻氧化应激损伤,发挥脑保护作用。刘俊等^[10]研究发现,丁苯酞可通过降低大鼠脑组织炎症因子的表达改善脑水肿状态;Wang 等^[11]也发现,丁苯酞在脑震荡性脑损伤中可明显降低脑组织含水率,具有较好的脑保护作用。这些机制可能是丁苯酞在脑损伤急性期发挥神经保护作用的机制。

BDNF 做为内源性神经保护剂,参与了神经细胞修复和神经功能恢复。颅脑损伤后 BDNF 可促进神经细胞再生和神经网络重建,减轻继发性损伤的影响^[12-13]。本研究发现,小鼠颅脑损伤后 14 d,海马及前额叶内侧皮质 BDNF 表达有明显下调,这可能是外伤的直接影响,并进一步延缓外伤后神经修复。外源性补充 BDNF 难以通过血脑屏障发挥作用,而丁苯酞干预能明显上调海马及前额叶内侧皮质 BDNF 的表达、促进内源性 BDNF 功能,一般认为这两个脑区与学习认知密切相关,因此这可能是丁苯酞发挥脑保护作用的机制之一。本研究发现,与假手术组比,手术对照组、丁苯酞处理 1 组和 2 组的神经元凋亡率明显升高;与手术对照组比,丁苯酞处理 1 组和 2 组的神经元凋亡率明显降低,这从组织细胞层面表明,丁苯酞可降低颅脑损伤后神经元的凋亡,从而对神经功能起到保护作用。一项有关丁苯酞对脑瘫大鼠海马神经元凋亡的影响的研究^[14]发现,丁苯酞可能通过介导磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B 信号通路,调控 B 细胞淋巴瘤-2 相关蛋白表达,抑制海马神经元凋亡,促进神经功能康复。但颅脑损伤后,丁苯酞影响神经元凋亡的具体机制仍有待进一步明确。

综上,丁苯酞可改善小鼠 TBI 后空间记忆功能,对认知损伤具有一定的神经保护作用,上调海马及前额叶内侧皮质 BDNF 表达及抑制海马区神经元的凋亡可能是其潜在机制。

参考文献

- [1] Giner J, Mesa Galán L, Yus Teruel S, *et al.* Traumatic brain injury in the new millennium: new population and new management [J]. *Neurologia*, 2022, 37 (5): 383 - 389.
- [2] Aida V, Niedzielko TL, Szaflarski JP, *et al.* Acute administration of perampnolol, an AMPA receptor antagonist, reduces cognitive impairments after traumatic brain injury in rats [J]. *Experimental Neurology*, 2020, 327: 113222.
- [3] Nguyen T, Nguyen N, Cochran AG, *et al.* Repeated closed-head mild traumatic brain injury-induced inflammation is associated with nociceptive sensitization [J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2023, 20 (1): 196.
- [4] Zhang C, Zhao S, Zang Y, *et al.* The efficacy and safety of DL-3-n-butylphthalide on progressive cerebral infarction: a randomized controlled STROBE study [J]. *Medicine*, 2017, 96 (30): e7257.
- [5] 邵枝定, 许忠强, 许利. 丁苯酞联合阿司匹林、阿加曲班治疗急性脑梗死的疗效 [J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43 (3): 523 - 526.
- [6] Zhao Y, Lee JH, Chen D, *et al.* DL-3-n-butylphthalide induced neuroprotection, regenerative repair, functional recovery and psychological benefits following traumatic brain injury in mice [J]. *Neurochemistry International*, 2017, 111: 82 - 92.
- [7] 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.
- [8] Younger D, Murugan M, Rama Rao KV, *et al.* Microglia receptors in animal models of traumatic brain injury [J]. *Molecular Neurobiology*, 2019, 56 (7): 5202 - 5228.
- [9] Han J, Shi X, Xu J, *et al.* DL-3-n-butylphthalide prevents oxidative stress and atherosclerosis by targeting Keap-1 and inhibiting Keap-1/Nrf-2 interaction [J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 2022, 172: 106164.
- [10] 刘俊, 杨枫, 江健, 等. 丁苯酞对大鼠感染性脑水肿炎症和氧化应激的影响 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30 (13): 1976 - 1980.
- [11] Wang ZG, Sharma A, Feng L, *et al.* Co-administration of dl-3-n-butylphthalide and neprilysin is neuroprotective in Alzheimer disease associated with mild traumatic brain injury [J]. *International Review of Neurobiology*, 2023, 172: 145 - 185.
- [12] Yan J, Zhang Y, Wang L, *et al.* TREM2 activation alleviates neural damage via Akt/CREB/BDNF signalling after traumatic brain injury in mice [J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2022, 19 (1): 289.
- [13] Hung SY, Chung HY, Luo ST, *et al.* Electroacupuncture improves TBI dysfunction by targeting HDAC overexpression and BDNF-associated Akt/GSK-3 β signaling [J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2022, 16: 880267.
- [14] 袁琳, 李洁, 王芳, 等. 丁苯酞对脑瘫大鼠 PI3K/Akt 信号通路及海马神经元凋亡的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42 (19): 4819 - 4823.

(收稿日期: 2023 - 11 - 01

修回日期: 2023 - 12 - 19)