

· 实验研究 ·

巴曲酶对缺血性眩晕大鼠及其脑组织 Nrf2/HO-1 信号通路的影响

陈玄, 闫一敏, 魏璐璐

南阳市中心医院, 河南 南阳 473000

摘要:目的 探讨巴曲酶对缺血性眩晕大鼠眩晕症状、抗氧化指标、炎症因子、血液流变学指标及脑组织 NF-E2-相关因子 2/血红素氧合酶 1 (Nrf2/HO-1) 信号通路的影响。方法 40 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、巴曲酶组(尾 iv 1 BU/kg)、NRF2 抑制剂 (ML385) 组 (ip 30 mg/kg)、巴曲酶+ML385 组 (尾 iv 1 BU/kg 巴曲酶后 ip 30 mg/kg ML385), 每组 8 只, 除假手术组外, 其余各组大鼠均通过结扎右侧颈动脉及右侧锁骨下动脉构建缺血性眩晕大鼠模型, 造模成功后按照各组给药方式进行给药处理, 持续 1 周。全自动血液流变分析仪检测各组大鼠血液流变学指标, 眩晕实验测定各组大鼠眩晕症状的变化程度; 苏木精-伊红染色 (HE) 检测大鼠脑组织病理变化; 酶联免疫吸附 (ELISA) 试剂盒检测大鼠血清一氧化氮 (NO)、内毒素 (ET), 脑组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 水平; 蛋白免疫印迹 (WB) 法检测大鼠脑组织中 Nrf2/HO-1 通路蛋白表达。**结果** 与假手术组相比, 模型组大鼠跳台逃避潜伏期显著延长, 眩晕症状、脑组织神经细胞受损严重, 血液流变学指标, 血清 NO 和 ET 水平, 脑组织中 TNF- α 、IL-1 β 、MDA 水平显著升高, SOD 水平及 Nrf2、HO-1 蛋白表达显著降低。与模型组相比, 巴曲酶组大鼠眩晕症状、脑组织神经细胞受损得到缓解, 血液流变学指标、血清 NO 和 ET 水平、脑组织中 TNF- α 、IL-1 β 、MDA 水平显著降低, 脑组织 SOD 水平及 Nrf2、HO-1 蛋白表达显著升高; ML385 组大鼠眩晕症状及各项指标与模型组变化趋势相似且更严重; 与巴曲酶组相比, 巴曲酶+ML385 组大鼠眩晕症状、脑组织神经细胞受损严重, 血液流变学指标, 血清 NO 和 ET 水平, 脑组织中 TNF- α 、IL-1 β 、MDA 水平显著升高, SOD 水平及 Nrf2、HO-1 蛋白表达显著降低。**结论** 巴曲酶可能通过改善血液流变学、提高抗氧化能力、抑制炎症因子分泌及启动 Nrf2/HO-1 通路发挥对缺血性眩晕的保护作用。

关键词: 巴曲酶; 缺血性眩晕; 脑组织; NF-E2-相关因子 2/血红素氧合酶 1

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2021)08 - 1549 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.08.001

Effect of batroxobin on ischemic vertigo rats and Nrf2/HO-1 signaling pathway in cerebral tissue

CHEN Xuan, YAN Yi-min, WEI Lu-lu

Nanyang Central Hospital, Nanyang 473000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of batroxobin on vertigo symptoms, antioxidant indicators, inflammatory factors, blood rheological indicators, and Nrf2/HO-1 signaling pathway in the brain of ischemic vertigo rats. **Methods** Forty Sprague Dawley rats were randomly divided into sham operation group, model group, batroxobin group (tail vein injection of 1 BU/kg), ML385 group (intraperitoneal injection of 30 mg/kg), batroxobin + ML385 group (intraperitoneal injection of 30 mg/kg ML385 after intravenous injection of 1 BU/kg batroxobin), with 8 rats in each group, except the sham operation group, the other groups of rats were ligated right carotid artery and right subclavian artery to build ischemic vertigo rat model. After successful modeling, the rats were given drugs according to the way of administration in each group, lasting for 1 week. The indexes of hemorheology were detected by automatic hemorheology analyzer, and the severity of vertigo was measured by vertigo test; the pathological changes of brain tissue were detected by hematoxylin eosin staining (HE); the levels of serum NO, ET, TNF- α , IL-1 β , SOD, and MDA were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the expression of Nrf2/HO-1 pathway proteins was detected by Western blot. **Results** Compared with the sham operation group, the escape latency of the model group was significantly extended, the symptoms of vertigo and the damage of nerve cells in brain tissue were serious, hemorheological parameters, levels of NO, ET in serum, levels of TNF- α , IL-1 β and MDA in

收稿日期: 2021-03-19

基金项目: 河南省中医药科学研究专项课题 (2019ZY3035)

作者简介: 陈玄 (1990—), 女, 本科, 住院医师。E-mail: cdge1214@163.com

brain tissue were significantly increased, but the level of SOD, expression of Nrf2 and HO-1 protein were significantly decreased. Compared with the model group, the symptoms of vertigo and the damage of nerve cells in brain tissue were alleviated in batroxobin group, hemorheological parameters, levels of NO, ET in serum, levels of TNF- α , IL-1 β and MDA in brain tissue were significantly decreased, the levels of SOD, expression of Nrf2 and HO-1 protein were significantly increased. In ML385 group, the symptoms of vertigo and nerve cell damage were serious, hemorheological parameters, levels of NO, ET in serum, levels of TNF- α , IL-1 β and MDA in brain tissue were significantly increased, but the levels of SOD, expression of Nrf2 and HO-1 protein were significantly decreased. Compared with batroxobin group, vertigo symptoms and damaged nerve cells in brain tissue in batroxobin + ML385 group were more severe, hemorheological parameters, levels of NO, ET in serum, levels of TNF- α , IL-1 β and MDA in brain tissue were significantly increased, level of SOD, expression of Nrf2 and HO-1 protein were significantly decreased. **Conclusion** Batroxobin may protect ischemic vertigo by improve blood rheology, improve antioxidant ability, inhibit the secretion of inflammatory factors and activating Nrf2/HO-1 pathway.

Key words: batroxobin; ischemic vertigo; brain tissue; NF-E2-related factor 2/heme oxygenase 1

眩晕是机体对空间定位障碍而产生的一种位置性、动性错觉,常有平衡功能失调、空间定向障碍等特点,患者常会有漂移、旋转、沉浮、翻滚等感觉^[1-2]。眩晕病因复杂,与前庭神经元炎症、细菌感染、动脉供血不足、遗传等因素均相关,其中以动脉供血不足为常见诱因,脑组织血循环障碍会造成前庭组织血流减少及功能障碍,引发脑组织神经细胞发生炎症反应及氧化应激反应,进而引起患者站立不稳、恶心、倾倒、呕吐等神经机能障碍表现,严重影响患者的生活质量^[3]。巴曲酶是提取于矛头蛇蛇毒的一种去纤维蛋白酶,具有抑制血栓形成、降低血液黏度、增加血流速度、改善微循环等作用,对神经元及脊髓具有一定的保护作用^[4]。尚丽等^[5]研究发现巴曲酶可显著减轻后循环缺血性眩晕患者病情,但关于其相关作用机制仍不清晰。近年来的研究表明 NF-E2-相关因子 2/血红素氧合酶 1 (Nrf2/HO-1) 信号通路在血管新生、炎症反应、免疫调节、氧化应激反应等过程中具有调节作用,与脑缺血性疾病联系密切^[6]。Hu 等^[7]研究发现启动 Nrf2/HO-1 信号通路可显著改善脑缺血引起脑组织炎症及氧化应激反应,并对神经功能具有一定的保护作用,但关于 Nrf2/HO-1 信号通路及缺血性眩晕之间的研究较少。因此本研究探究了巴曲酶对缺血性眩晕大鼠脑组织 Nrf2/HO-1 信号通路的影响,为其临床治疗缺血性眩晕提供依据。

1 材料

1.1 实验动物

40 只 SD 雄性大鼠购于广东省医学实验动物中心,均为 SPF 级,生产许可证号为 SCXK (粤) 2016-0002, 6~8 周龄,体质量约 180 g。所有大鼠于本院动物房中适应性饲养 1 周,动物房温度 25 °C 左右,相对湿度 50% 左右,保持动物房环境及鼠笼清洁、透气。在实验过程中按照动物使用的“3R”

原则给予人道主义关怀。本研究经南阳市中心医院动物伦理委员会批准同意(批号 20190109-1348)。

1.2 主要试剂及仪器

巴曲酶注射液(生产批号 20200904,规格 0.5 mL:5 BU)购于北京托毕西药业有限公司;NRF2 抑制剂(ML385,质量分数 \geq 98%,货号 abs47046126)购于爱必信(上海)生物科技有限公司;HE 染色试剂盒(货号 E607218-0200)购于生工生物工程上海股份有限公司;肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA) ELISA 试剂盒(货号分别为 AD30104、AD30079、AD31050、AD30360)购于武汉艾迪抗生物技术有限公司;大鼠一氧化氮(NO)、内毒素(ET) ELISA 试剂盒(货号分别为 69-27865、69-80224)购于武汉默沙克生物技术有限公司;HE 染色试剂盒、蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号分别为 AR1180、AR0106、AR0197)购于武汉博士德生物工程有限公司;兔源 Nrf2、HO-1、GAPDH 一抗及羊抗兔 IgG 二抗(货号分别为 ab137550、ab189491、ab9485、ab6721)购于英国 Abcam 公司。

TrecCO2 激光多普勒血流仪购于瑞典 Perimed 公司;YLS-3Tb 跳台记录仪购于安徽正华生物仪器设备有限公司;PHERAstar FSX 多功能酶标仪购于德国 BMG;Bio Scope Resolve 倒置光学显微镜购于美国布鲁克公司。

2 方法

2.1 动物模型制备及前庭血流量检测

40 只 SD 大鼠按照随机数字法分为假手术组(8 只)和造模组(32 只)。缺血性眩晕大鼠模型的制备参考文献方法^[8]并稍作改动,将大鼠麻醉后呈仰卧位固定,颈部消毒并剪开皮肤,分离肌肉后暴露分离颈总动脉,穿线结扎右侧颈动脉及右侧锁骨下

动脉；假手术组大鼠仅分离颈总动脉，不做结扎处理，然后依次缝合伤口。造模过程中出现大鼠死亡现象，立即选取备用大鼠进行造模处理。

术前术后均检测大鼠前庭组织血流量，将分离颈总动脉的大鼠固定于三维脑立体定位仪上，定位于大鼠右侧前庭神经核^[8]，采用激光多普勒血流仪测定结扎术前大鼠前庭组织血流量，血流平稳后结扎相应动脉（右侧颈动脉及右侧锁骨下动脉），记录结扎后5、10、15、20、25、30 min大鼠前庭组织血流量，根据公式计算血流下降率。术后大鼠前庭组织血流量显著下降，5 min血流量下降率至少为5%，且第2天仍存活的大鼠为模型构建成功。

血流下降率 = (结扎前血流量 - 结扎后血流量) / 结扎前血流量

2.2 分组和给药

将造模成功的大鼠按照随机数字法分为模型组、巴曲酶组（尾 iv 1 BU/kg）^[9]、ML385组（Nrf2抑制剂，ip 30 mg/kg ML385）^[10]、巴曲酶+ML385组（尾 iv 1 BU/kg 巴曲酶后 ip 30 mg/kg ML385），每组8只。造模后1 h，按照各组给药剂量进行给药处理，模型组及假手术组仅 ip 及尾 iv 等量生理盐水，连续给药1周。

2.3 眩晕测试

每次给药后1 h进行跳台逃避电刺激反射训练，将大鼠置于跳台记录仪中适应3 min，连续给予电刺激（30 V、50 Hz）5 min，大鼠跳上平台并维持30 s为训练成功，每天训练2次，连续训练3 d。第4天，将大鼠置于离心机中，500 r/min的速度旋转30 s，骤停后将大鼠置于跳台仪中，记录从受到电刺激到第1次跳上平台并30 s内不跌落所需的时间为跳台逃避潜伏期，该值越高表明大鼠眩晕症状越严重。

2.4 大鼠血液流变学指标和血清 NO、ET 测定

眩晕测试结束后，将大鼠麻醉后腹主动脉取血4 mL，采用全自动血液流变分析仪检测全血黏度（WBV）、血浆黏度（PV）、红细胞压积（HCT）、血沉方程K值（ESRK）、红细胞聚集指数（EAI）。采用NO、ET ELISA相关试剂盒测定各组大鼠血清NO、ET水平，具体操作方法参考试剂盒中说明书的要求。

2.5 大鼠脑组织病理学观察

将大鼠处死，取大鼠右侧脑组织，一部分用于HE染色，另一部分用于后续指标测定。将脑组织置

于4%多聚甲醛中固定24 h，经自动组织脱水机脱水、透明处理后浸入融化的石蜡中，待包埋有脑组织的蜡块凝固后进行切片处理，经过展片、捞片、烘干、烤片后按照HE染色试剂盒中的操作步骤进行HE处理，将得到的组织病理切片于显微镜下观察并分析。

2.6 大鼠脑组织 TNF- α 、IL-1 β 、SOD、MDA 水平检测

取2.5项下部分大鼠脑组织，置于匀浆机匀浆，3 500 r/min离心10 min后取上清液，采用TNF- α 、IL-1 β 、SOD、MDA ELISA试剂盒测定大鼠脑组织中TNF- α 、IL-1 β 、SOD、MDA水平。

2.7 大鼠脑组织 Nrf2/HO-1 通路蛋白表达检测

取2.5项下部分大鼠脑组织，经生理盐水冲洗后轻轻拭干，采用蛋白质提取试剂盒提取其中蛋白质，采用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定其中蛋白质浓度，将各组大鼠脑组织蛋白浓度调至相同，加热变性后冷却，取20 μ L进行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳实验分离蛋白，将分离的蛋白采用湿转法转移到聚偏二氟乙烯膜上，将目的条带蛋白剪下，用5%的脱脂奶粉进行封闭处理，加入兔源Nrf2、HO-1、GAPDH一抗（稀释比为1:2 000），4 $^{\circ}$ C冰箱中孵育过夜，用TBST缓冲溶液洗涤后加入辣根过氧化物标记的羊抗兔二抗溶液（稀释比为1:1 000）并室温孵育2 h，用TBST再次漂洗，显色后置于凝胶成像仪中观察并拍照分析。

2.8 统计学分析

采用SPSS 22.0软件统计分析实验数据，计量数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较进行单因素方差分析，进一步两组间比较行LSD-*t*检验， $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 造模大鼠前庭血流量比较

造模大鼠结扎右侧颈动脉及右侧锁骨下动脉后前庭组织血流量显著下降（ $P < 0.05$ ），且随着结扎时间的延长血流量减少增多，在结扎后20 min血流量趋于稳定，结扎后5、10、15、20、25、30 min血流量下降率分别为15.85%、21.38%、28.60%、30.95%、31.48%、32.55%。如图1。

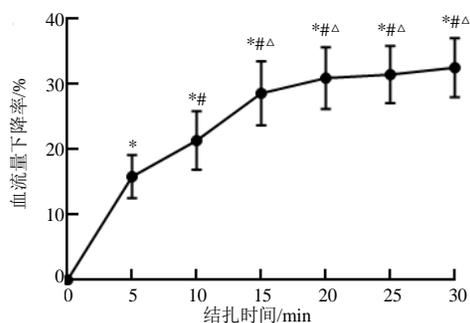
3.2 各组大鼠跳台逃避潜伏期比较

与假手术组相比，模型组大鼠跳台潜伏期显著延长（ $P < 0.05$ ）；与模型组相比，巴曲酶组大鼠跳台潜伏期显著缩短（ $P < 0.05$ ），ML385组大鼠跳台潜伏期显著延长（ $P < 0.05$ ）；与巴曲酶组相比，巴

曲酶+ML385 组大鼠跳台潜伏期显著延长 ($P < 0.05$); 与 ML385 组相比, 巴曲酶+ML385 组大鼠跳台潜伏期显著缩短 ($P < 0.05$), 见表 1。

3.3 各组大鼠血液流变学指标和血清 NO、ET 水平比较

与假手术组相比, 模型组大鼠 WBV、PV、ESRK、EAI 及血清 NO、ET 水平显著升高 ($P < 0.05$);



与结扎 0 min 相比: * $P < 0.05$; 与结扎 5 min 相比: # $P < 0.05$; 与结扎 10 min 相比: Δ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs ligation at 0 min; # $P < 0.05$ vs ligation at 5 min; Δ $P < 0.05$ vs ligation at 10 min

图 1 造模大鼠前庭血流量比较 ($n=32$)

Fig. 1 Comparison of vestibular blood flow of rats ($n=32$)

表 1 各组大鼠跳台逃避潜伏期比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Comparison of the escape latency period of rat in each groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量	跳台逃避潜伏期/s
假手术	—	81.22 ± 10.92
模型	—	183.28 ± 19.26*
巴曲酶	1 BU·kg ⁻¹	94.52 ± 12.16#
ML385	30 mg·kg ⁻¹	205.18 ± 15.56#
巴曲酶+ML385	1BU·kg ⁻¹ +30mg·kg ⁻¹	155.60 ± 18.43 ^Δ ▲

与假手术组相比: * $P < 0.05$; 与模型组相比: # $P < 0.05$; 与巴曲酶组相比: Δ $P < 0.05$; 与 ML385 组相比: ▲ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham-operated group; # $P < 0.05$ vs model group; Δ $P < 0.05$ vs batroxobin group; ▲ $P < 0.05$ vs ML385 group

表 2 各组大鼠血液流变学指标和血清 NO、ET 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Comparison of blood rheological indexes and serum levels of NO, ET of rats in each groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量	WBV/(mPa·s)	PV/(mPa·s)	ESRK	EAI	NO/(μmol·L ⁻¹)	ET/(pg·mL ⁻¹)
假手术	—	13.95 ± 0.80	1.37 ± 0.10	5.20 ± 0.10	5.83 ± 0.23	99.31 ± 6.68	47.14 ± 9.82
模型	—	18.38 ± 1.13*	1.89 ± 0.22*	6.63 ± 0.44*	6.89 ± 0.48	131.26 ± 10.40	112.49 ± 22.02
巴曲酶	1 BU·kg ⁻¹	15.02 ± 0.94#	1.50 ± 0.13#	5.44 ± 0.22#	6.10 ± 0.26#	106.93 ± 7.13#	65.16 ± 13.49#
ML385	30 mg·kg ⁻¹	20.06 ± 1.32#	2.16 ± 0.28#	7.28 ± 0.72#	7.60 ± 0.80#	151.36 ± 11.53#	135.58 ± 31.82#
巴曲酶+ML385	1BU·kg ⁻¹ +30mg·kg ⁻¹	16.93 ± 1.05 ^Δ ▲	1.67 ± 0.17 ^Δ ▲	5.94 ± 0.34 ^Δ ▲	6.43 ± 0.34 ^Δ ▲	117.59 ± 9.75 ^Δ ▲	87.11 ± 17.59 ^Δ ▲

与假手术组相比: * $P < 0.05$; 与模型组相比: # $P < 0.05$; 与巴曲酶组相比: Δ $P < 0.05$; 与 ML385 组相比: ▲ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham-operated group; # $P < 0.05$ vs model group; Δ $P < 0.05$ vs batroxobin group; ▲ $P < 0.05$ vs ML385 group

与模型组相比, 巴曲酶组大鼠 WBV、PV、ESRK、EAI 和血清 NO、ET 水平显著降低 ($P < 0.05$), ML385 组大鼠 WBV、PV、ESRK、EAI 和血清 NO、ET 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与巴曲酶组相比, 巴曲酶+ML385 组大鼠 WBV、PV、ESRK、EAI 及血清 NO、ET 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与 ML385 组相比, 巴曲酶+ML385 组大鼠 WBV、PV、ESRK、EAI 及血清 NO、ET 水平显著降低 ($P < 0.05$), 见表 2。

3.4 各组大鼠脑组织病理学观察

假手术组大鼠脑组织形态基本正常, 神经细胞数量较多且结构正常; 与假手术组相比, 模型组大鼠脑组织结构较疏松, 神经细胞数量显著减少且结构异常, 细胞出现细胞核偏移、体积增大、空泡化等; 与模型组相比, 巴曲酶组大鼠脑组织结构及神经细胞数量得到一定的缓解, ML385 组大鼠脑组织损伤较重; 与巴曲酶组相比, 巴曲酶+ML385 组脑组织损伤较严重; 与 ML385 组相比, 巴曲酶+ML385 组脑组织损伤得到缓解, 见图 2。

3.5 各组大鼠脑组织 TNF-α、IL-1β、SOD、MDA 水平比较

与假手术组相比, 模型组大鼠脑组织 TNF-α、IL-1β、MDA 水平显著升高, SOD 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 巴曲酶组大鼠脑组织 TNF-α、IL-1β、MDA 水平显著降低, SOD 水平显著升高 ($P < 0.05$), ML385 组大鼠脑组织 TNF-α、IL-1β、MDA 水平显著升高, SOD 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与巴曲酶组相比, 巴曲酶+ML385 组大鼠脑组织 TNF-α、IL-1β、MDA 水平显著升高, SOD 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与 ML385 组相比, 巴曲酶+ML385 组大鼠脑组织 TNF-α、IL-1β、MDA 水平显著降低, SOD 水平显著升高 ($P < 0.05$), 见表 3。

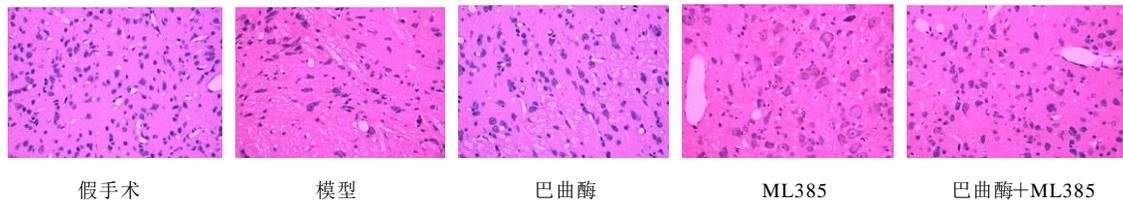


图 2 各组大鼠脑组织病理学观察 (×200)

Fig. 2 Brain hiopathological observation of rat in each groups (×200)

表 3 各组大鼠脑组织 TNF-α、IL-1β、SOD、MDA 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Comparison of TNF-α, IL-1β, SOD, and MDA level of rat brain tissue in each groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)	IL-1β/(pg·mL ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)
假手术	—	12.98±2.70	16.49±3.43	52.09±9.85	1.18±0.24
模型	—	34.51±8.03*	38.43±8.64*	24.54±5.94*	3.87±0.82*
巴曲酶	1 BU·kg ⁻¹	17.01±4.14 [#]	24.55±5.91 [#]	41.93±8.88 [#]	1.95±0.40 [#]
ML385	30 mg·kg ⁻¹	44.50±9.44 [#]	64.50±10.14 [#]	18.47±5.30 [#]	5.06±1.18 [#]
巴曲酶+ML385	1 BU·kg ⁻¹ +30 mg·kg ⁻¹	24.06±5.87 ^{△▲}	52.80±9.86 ^{△▲}	32.59±7.39 ^{△▲}	3.08±0.62 ^{△▲}

与假手术组相比: *P<0.05; 与模型组相比: #P<0.05; 与巴曲酶组相比: △P<0.05; 与 ML385 组相比: ▲P<0.05

*P<0.05 vs sham-operated group; #P<0.05 vs model group; △P<0.05 vs batroxobin group; ▲P<0.05 vs ML385 group

3.6 大鼠脑组织 Nrf2/HO-1 通路蛋白表达比较

与假手术组相比, 模型组大鼠脑组织 Nrf2、HO-1 蛋白表达显著降低(P<0.05); 与模型组相比, 巴曲酶组大鼠脑组织 Nrf2、HO-1 蛋白表达显著升高(P<0.05), ML385 组大鼠脑组织 Nrf2、HO-1 蛋白表达显著降低(P<0.05); 与巴曲酶组相比, 巴曲酶+ML385 组大鼠脑组织 Nrf2、HO-1 蛋白表达显著降低(P<0.05); 与 ML385 组相比, 巴曲酶+ML385 组大鼠脑组织 Nrf2、HO-1 蛋白表达显著升高(P<0.05), 见表 4、图 3。

表 4 各组大鼠脑组织 Nrf2/HO-1 通路蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Comparison of Nrf2/HO-1 pathway protein expression of rat brain tissue in each groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量	Nrf2/GAPDH	HO-1/GAPDH
假手术	—	1.03±0.22	1.05±0.21
模型	—	0.36±0.07*	0.53±0.09*
巴曲酶	1 BU·kg ⁻¹	0.81±0.15 [#]	0.84±0.17 [#]
ML385	30 mg·kg ⁻¹	0.24±0.04 [#]	0.45±0.04 [#]
巴曲酶+ML385	1 BU·kg ⁻¹ +30 mg·kg ⁻¹	0.55±0.12 ^{△▲}	0.69±0.12 ^{△▲}

与假手术组相比: *P<0.05; 与模型组相比: #P<0.05; 与巴曲酶组相比: △P<0.05; 与 ML385 组相比: ▲P<0.05

*P<0.05 vs sham-operated group; #P<0.05 vs model group; △P<0.05 vs batroxobin group; ▲P<0.05 vs ML385 group

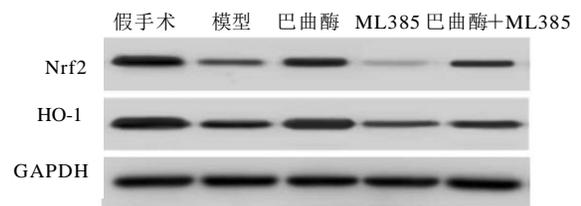


图 3 各组大鼠脑组织 Nrf2/HO-1 通路蛋白表达比较

Fig. 3 Comparison of Nrf2/HO-1 pathway protein expression of rat brain tissue in each groups

4 讨论

眩晕是临床常见的疾病之一, 发病机制复杂且牵涉学科广泛, 缺血性眩晕是由于前庭感受器、前庭神经和相应中枢缺血导致的眩晕, 常有步态不稳、恶心呕吐、定位错误等不良表现。前庭系统在维持机体平衡方面发挥重要作用, 感受器接受外界刺激后将信息传递给前庭系统, 再经前庭神经核经过相应神经通路传到更高级的中枢, 前庭感受器对动脉供血很敏感, 血流量稍有下降即可产生恶心、眩晕等不良表现^[11-12]。数据显示, 结扎右侧颈动脉、右侧锁骨下动脉后可造成脑组织局部缺血, 脑组织血流灌注不足可引起脑内炎症反应及氧化应激反应失调, 进而导致神经细胞结构损害^[13-14]。血液流变学异常、血管活性因子 NO 与 ET 平衡失调可导致血液黏度及血流阻力增加, 造成微循环障碍、内皮细胞功能障碍, 与眩晕疾病的发生发展联系密

切。张方等^[15]研究发现,眩晕患者 WBV、PV、ESRK、EAI 等血液流变学指标及血清 NO、ET 水平均显著降低,严重影响患者的生活质量。因此,探究眩晕发生机制及有效治疗方法仍是重中之重,研究中常通过结扎右侧颈动脉及右侧锁骨下动脉构建缺血性眩晕大鼠模型,该方法简单易行、缺血程度稳定、与缺血性眩晕临床表现较为符合^[16]。本研究结果显示,与造模前相比,造模后大鼠前庭血流量显著减少,与假手术组相比,模型组大鼠跳台逃避潜伏期显著延长,大鼠脑组织结构较疏松,神经细胞数量显著减少且结构异常,细胞出现细胞核偏移、体积增大、空泡化等现象, WBV、PV、ESRK、EAI、血清 NO、ET 水平、脑组织 TNF- α 、IL-1 β 、MDA 水平显著升高, SOD 水平显著降低,提示结扎相应动脉后导致前庭功能紊乱,进而引发眩晕的发生,表明缺血性眩晕大鼠模型构建成功。

巴曲酶是临床上抗血小板治疗的常用药物,在短暂性脑缺血治疗中发挥重要作用,主要通过作用于血浆纤维蛋白 A2 链促使纤维酶原成为纤溶酶,从而抑制血栓的形成,同时还具有增强血管通透性、抑制红细胞聚集、降低血液黏度、改善局部微循环、改善脑部氧代谢等作用^[17-18]。近些年的研究发现,巴曲酶还具有改善突发性耳聋引起的眩晕,可显著降低眩晕缓解时间^[19-20],苏辉等^[21]研究发现巴曲酶对脑外伤大鼠神经功能恢复具有一定的促进作用,并认为其可能通过减少内皮细胞凋亡、抑制炎症细胞浸润、促进脑损伤区神经元存活等发挥脑功能保护作用。本研究结果显示,与模型组相比,巴曲酶组大鼠跳台逃避潜伏期显著缩短,脑组织结构及神经细胞数量得到一定的缓解, WBV、PV、ESRK、EAI 及血清 NO、ET 水平和脑组织 TNF- α 、IL-1 β 、MDA 水平显著降低, SOD 水平显著升高,提示巴曲酶具有抑制缺血导致的脑组织炎症反应及提高脑组织抗氧化能力,并显著缓解大鼠的眩晕症状。

Nrf2 是一种碱性蛋白,应激状态下 Nrf2 被活化,活化的 Nrf2 可启动其下游信号 HO-1,进而发挥抑制炎症反应、抗氧化应激、免疫调节、清除自由基等作用^[22]。Deng 等^[23]研究发现启动 Nrf2/HO-1 通路后可显著改善糖尿病合并脑缺血大鼠的神经功能、降低脑梗死体积、提高大鼠脑组织中 SOD 水平。Li 等^[24]研究发现,上调机体 Nrf2、HO-1 表达可显著改善脑缺血再灌注引起的神经功能障碍,

可显著降低 MDA 水平,并对脑组织具有一定的保护作用。Ji 等^[25]研究发现,启动 Nrf2/HO-1 通路可显著改善缺血再灌注引起的脑组织神经元损伤。本研究结果显示,与模型组相比,ML385 组大鼠逃避潜伏期显著延长,脑组织结构受到损害,神经细胞数量显著减少, WBV、PV、ESRK、EAI 及血清 NO、ET 水平和脑组织中 TNF- α 、IL-1 β 、MDA 水平显著升高, SOD 水平显著降低,提示抑制 Nrf2/HO-1 通路可造成大鼠脑组织氧化应激、炎症反应加剧,进而损害大鼠脑组织并引起眩晕症状加重。赵艳等^[26]研究显示,巴曲酶可改善突发性耳聋患者血流动力学、凝血功能,并降低氧化应激反应。本研究结果显示,与 ML385 组相比,巴曲酶+ML385 组大鼠 WBV、PV、ESRK、EAI 及血清 NO、ET 水平、跳台潜伏期和脑组织 TNF- α 、IL-1 β 、MDA 水平显著降低,脑组织 SOD 水平及 Nrf2/HO-1 通路蛋白表达显著升高,脑组织损伤得到缓解,提示巴曲酶能上调 Nrf2/HO-1 通路,减轻大鼠眩晕症状,恢复受损脑组织,抑制脑组织炎性,提升抗氧化能力,改善血液流变学指标及血清 NO、ET 水平表达情况,发挥缺血性眩晕保护作用。

综上所述,巴曲酶对缺血性眩晕大鼠具有一定的缓解作用,可能通过改善血液流变学、抗氧化、抗炎及启动 Nrf2/HO-1 通路等发挥作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 周建峰. 康进忠应用温胆汤加减治疗眩晕经验 [J]. 实用中医药杂志, 2019, 35(2): 237-238.
- [2] 徐杰. 天麻素注射液联合前列地尔治疗后循环缺血性眩晕临床研究 [J]. 新中医, 2021, 53(14): 75-77.
- [3] 郭晟, 周承志. 程伟运用建瓩汤治疗眩晕病机理探讨及验案举隅 [J]. 湖北中医杂志, 2020, 42(9): 16-18.
- [4] Fan H, Liu X, Tang H B, et al. Protective effects of batroxobin on spinal cord injury in rats [J]. *Neurosci Bull*, 2013, 29(4): 501-508.
- [5] 尚丽, 郭晶敏, 顾娟. 巴曲酶治疗后循环缺血性眩晕疗效观察 [J]. 牡丹江医学院学报, 2010, 31(4): 56.
- [6] 高原, 于文慧, 张美君, 等. Nrf2/HO-1 信号通路与缺血再灌注损伤的研究进展 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2020, 26(4): 776-778.
- [7] Hu Y, Duan M, Liang S, et al. Senkyunolide I protects rat brain against focal cerebral ischemia-reperfusion injury by up-regulating p-Erk1/2, Nrf2/HO-1 and inhibiting caspase 3 [J]. *Brain Res*, 2015, 1605: 39-48.

- [8] 刘 阳, 孙建宁, 王 堃, 等. 缺血性眩晕大鼠模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(1): 10-13.
- [9] 郝春华, 张 蕊, 孙双勇, 等. 巴曲酶注射液对大鼠血栓栓塞性脑卒中急性超早期损伤的保护作用 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(7): 911-916.
- [10] 梅胜兰, 夏中元, 吴晓静, 等. Nrf2-Gpx4 信号通路在参麦注射液减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用: 与铁死亡的关系 [J]. 中华麻醉学杂志, 2019, 39(11): 1395-1398.
- [11] Kim H A, Yi H A, Lee H. Recent advances in cerebellar ischemic stroke syndromes causing Vertigo and hearing loss [J]. *Cerebellum*, 2016, 15(6): 781-788.
- [12] 严进华, 陈中波, 宋延娜, 等. 前庭电刺激与前庭康复在前庭疾病中的作用研究进展 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2020, 37(10): 958-960.
- [13] Seydyousefi M, Moghanlou A E, Metz G A S, et al. Exogenous adenosine facilitates neuroprotection and functional recovery following cerebral ischemia in rats [J]. *Brain Res Bull*, 2019, 153: 250-256.
- [14] Li T F, Ma J, Han X W, et al. Chrysin ameliorates cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats by regulating the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Neurochem Int*, 2019, 129: 104496.
- [15] 张 方, 李文杰, 董永书. 益肾定眩汤结合长春西汀注射液对后循环缺血性眩晕病人血液流变学、血清 NO、ET 水平及 TCD 指标的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(19): 3014-3018.
- [16] 徐浩锋, 黄 黎, 史东明, 等. 天麻素对缺血性眩晕大鼠脑损伤保护的作用研究 [J]. 中华危重症医学杂志: 电子版, 2017, 10(4): 261-263.
- [17] 张艳锋, 李文英, 史 婧, 等. 丁苯酞联合巴曲酶治疗短暂性脑缺血发作对患者脑血管动力学影响分析 [J]. 新疆医科大学学报, 2019, 42(4): 501-504.
- [18] 徐艳祥, 夏琳, 谢 艳, 等. 丁基苯酞联合巴曲酶治疗急性缺血性脑梗死的疗效及对血液流变学和凝血功能指标的影响 [J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(13): 1401-1404.
- [19] 张心怡, 张 静. 巴曲酶治疗突发性耳聋引起眩晕合并血栓患者的疗效观察 [J]. 血栓与止血学, 2021, 27(2): 264-265, 268.
- [20] 高陈恺, 马超武, 周 宇. 巴曲酶在射击训练相关爆震性聋治疗中的疗效研究 [J]. 东南国防医药, 2020, 22(2): 219-221.
- [21] 苏 辉, 戴宜武, 邹德非, 等. 巴曲酶早期应用对大鼠脑外伤后神经功能恢复的促进作用 [J]. 解放军医学院学报, 2016, 37(8): 879-883.
- [22] Cen J, Zhao N, Huang WW, et al. Polyamine analogue QMA attenuated ischemic injury in MCAO rats via ERK and Akt activated Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 844: 165-174.
- [23] Deng C H, Cao J, Han J Q, et al. Liraglutide activates the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway and protects brain nerve cells against cerebral ischemia in diabetic rats [J]. *Comput Intell Neurosci*, 2018, 2018: 3094504.
- [24] Li P, Su L, Li X, et al. Remote limb ischemic postconditioning protects mouse brain against cerebral ischemia/reperfusion injury via upregulating expression of Nrf2, HO-1 and NQO-1 in mice [J]. *Int J Neurosci*, 2016, 126(6): 552-559.
- [25] Ji Q, Gao J, Zheng Y, et al. Inhibition of microRNA-153 protects neurons against ischemia/reperfusion injury in an oxygen-glucose deprivation and reoxygenation cellular model by regulating Nrf2/HO-1 signaling [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2017, 31(7): 1-8.
- [26] 赵 艳, 赖世佳, 艾如涛, 等. 金纳多联合巴曲酶对 SHL 患者氧化应激、血流动力学及凝血功能的影响 [J]. 海南医学院学报, 2017, 23(21): 3028-3031.

[责任编辑 高 源]