

网络出版时间: 2022-04-01 11:08 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220330.1419.014.html>

灯盏花素通过调节 Nrf2 途径抑制大鼠颅内动脉瘤的形成和机制

艾奇渊, 王 勇, 徐瑞春, 彭 臻, 李劲松

摘要 目的 探究灯盏花素(Bre)对大鼠模型中颅内动脉瘤(IA)的形成和对核因子E2相关因子2(Nrf2)途径的影响。方法 通过弹性蛋白酶注射建立大鼠IA模型,将大鼠随机分为假手术组、模型组、Bre组,每组15只。Bre组每天腹腔注射50 mg/kg Bre,假手术组和模型组腹腔注射等体积生理盐水,持续3周,在此期间记录IA的发生率、生存率和收缩压,免疫荧光染色和qRT-PCR检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和平滑肌22 α (SM22 α)的表达。使用过氧化氢(H_2O_2 0.5 mmol/L)处理大鼠血管平滑肌细胞(VSMC)诱导氧化损伤,然后与Bre(100 μ mol/L)或(和)ML385(Nrf2抑制剂)共孵育,Western blot、qRT-PCR、ELISA、DCFH-DA荧光染色、流式细胞术分别检测Nrf2、收缩表型相关蛋白和炎性细胞因子的表达、活性氧的产生和细胞凋亡率。结果 在IA大鼠中,Bre处理上调核Nrf2的表达,改善IA病理变化,降低IA的发生率,改善生存率,并降低收缩压。在 H_2O_2 处理的VSMC中,Bre预处理升高Nrf2、抗氧化酶、 α -SMA和SM22 α 的表达,降低基质金属蛋白酶(MMP)-2和MMP-9表达、活性氧的产生和细胞凋亡,减轻脑动脉中炎性细胞浸润和促炎性细胞因子的表达。抑制Nrf2减弱了Bre预处理在 H_2O_2 处理的VSMC中的治疗效果。结论 Bre可有效降低VSMC中的氧化应激和炎症反应,从而减轻大鼠中IA的形成和破裂,其机制可能与Nrf2途径的激活有关。

关键词 颅内动脉瘤;灯盏花素; α -平滑肌肌动蛋白;核因子E2相关因子2;血管平滑肌细胞

中图分类号 R 743.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)04-0579-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.014

颅内动脉瘤(intracranial aneurysm, IA)破裂是蛛网膜下腔出血的主要原因,通常会导致神经功能衰竭或死亡。显微外科手术和血管内干预在治疗IA方面取得了重大进展,但发病率和死亡率仍然很高^[1]。IA发病机制包括IA相关的氧化应激、炎症和血管肌细胞功能障碍^[2]。因此,缓解炎症和氧化

应激的策略对于IA的治疗是迫切需要的。灯盏花素(brevicapsine, Bre)是从灯盏花中提取的一种黄酮类化合物,其基本活性成分是黄酮。它可以扩张血管,降低血液粘度和改善微循环,并作为氧自由基的清道夫^[3]。此外,Bre在治疗心血管和中枢神经系统疾病方面显示出积极的效果^[4-5]。Li et al^[6]研究发现Bre通过其抗炎和抗氧化作用减轻短暂性脑缺血/再灌注引起的认知障碍。Li et al^[7]研究表明Bre在创伤性脑损伤后通过调节核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2)信号通路提供神经保护作用。但Bre在颅内动脉瘤中的药理作用知之甚少。该研究通过建立IA大鼠模型和过氧化氢(H_2O_2)诱导血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)氧化损伤模型,探究Bre对IA形成及对Nrf2途径的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器 灯盏花素(brevicapsine, Bre, 纯度>98%) (美国Sigma-Aldrich公司);苏木精伊红(HE)染色试剂盒(货号C0105)、比辛酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(货号P0012)、ECL发光液(货号P0018S)、RIPA裂解缓冲液(货号P0013B)和活性氧检测试剂盒(货号S0033S) (碧云天生物公司);TRIzol试剂、NE-PER核和细胞质提取试剂(美国Thermo Scientific公司);One Step PrimeScriptTM III RT-qPCR Mix(大连宝生物工程有限公司);兔来源一抗Nrf-2(ab137550)、平滑肌22 α (smooth muscle 22 α , SM22 α)(ab14106)、Lamin B1(ab16048)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-2(ab92536)、MMP-9(ab76003)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG(ab205718)和山羊抗兔IgG H&L(Alexa Fluor[®] 488)(ab150077)、源一抗 β -肌动蛋白(β -actin)(ab8226)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)(ab7817)、山羊抗小鼠IgG H&L(Alexa Fluor[®] 647)(ab150115)、兔抗小鼠IgG H&L(HRP)(ab6728)(英国Abcam公司);白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-6、单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1)和

2022-03-07 接收

基金项目:贵州省科技合作计划(编号:黔科合LH字[2019]7162号)

作者单位:贵州医科大学第三附属医院神经外科, 都匀 558000

作者简介:艾奇渊,男,本科;

王 勇,男,副主任医师,责任作者, E-mail: wanyong19781130@163.com

肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); ML385 (Nrf2 抑制剂) (美国 MCE 公司); Annexin V/碘化丙啶 (PI) (美国 Invitrogen 公司)。Gel Doc XR + 凝胶成像系统 (美国伯乐公司), RX51 光学显微镜 (日本 Olympus 公司), 多功能紫外酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司), 高速离心机 (德国 Eppendorf 公司), 荧光显微镜 (德国徕卡), CytoFLEX 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司)。

1.2 动物建模和给药 SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只, 6~8 周龄, 体重 200~250 g, 购自贵州医科大学实验动物中心。动物饲养在温度 25℃ 左右、湿度 50% 左右, 12/12 h 光-暗环境中, 实验前适应性喂养 1 周。将大鼠随机分为 3 组 ($n=15$): 假手术组、模型组、Bre 组, Bre 剂量 (50 mg/kg) 根据 Li et al^[7] 研究确定。

造模方法^[8]及给药: 用 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠后, 结扎大鼠的右颈总动脉, 并将 10 μ l 的 10 U/ml 弹性蛋白酶立体定向注入基底池, 立即施用血管紧张素 II 以诱导全升高血压, 假手术组大鼠立体定向注射相等体积的生理盐水。Bre 组以 50 mg/kg 的剂量腹腔注射给药, 假手术组和模型组腹腔注射等体积生理盐水, 持续 3 周, 采用袖带法测量大鼠尾部收缩压。监测大鼠的存活 3 周, 取大鼠颈总动脉分叉部取动脉瘤组织标本和正常动脉组织标本, 检查 IA 的发病率和破裂。

1.3 免疫组化和 HE 染色 将动脉瘤组织和正常动脉组织固定在 10% 中性甲醛溶液中 24 h 后, 常规脱水、透明和石蜡包埋, 并切成 5 μ m 截面, 置于聚赖氨酸涂覆的载玻片上, 行 HE 染色。对于免疫组织化学分析, 用一抗 Nrf2 (1:200) 4℃ 孵育过夜, PBS 洗涤, DAB 显色 5 min, PBS 洗 3 次, 显微镜下观察。

1.4 免疫荧光染色 用 SM22 α (1:400) 和 α -SMA (1:200) 一抗在 4℃ 下孵育 5 μ m 切片过夜, PBS 洗涤 3 次, 加入荧光标记的二抗 (1:1000), 室温孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次, 封片, 荧光显微镜下观察。

1.5 分离培养大鼠 VSMC 和细胞分组 向雄性 SD 大鼠 ($n=5$) 注射肌肉松弛剂和麻醉剂, 处死后分离大鼠胸主动脉。去除组织的结缔外层, 并使用微型镊子剥离外膜。用镊子轻轻刮擦血管的内表面, 以除去内膜。然后, 将中膜切成 1 mm³ 的碎片, 并均匀地铺在 25 cm² 的培养瓶中。将所得 VSMC 在含有 10% 胎牛血清 (FBS)、100 U/ml 青霉素和

100 mg/ml 链霉素的 DMEM 中培养, 置于 37℃、5% CO₂ 的条件下。实验仅使用第 4~6 代的 VSMC。用单克隆 α -SMA 抗体进行的免疫荧光染色用于 VSMC 的鉴定和表征。

1.6 细胞分组和处理 本研究中用 H₂O₂ 0.5 mmol/L 处理 VSMC 12 h, 以诱导氧化损伤。VSMC 分组情况如下: 对照组、H₂O₂ (0.5 mmol/L) 组、H₂O₂ + Bre (100 μ mol/L) 组、H₂O₂ + Bre (100 μ mol/L) + ML385 (Nrf2 抑制剂) 组。上述分组 Bre (根据 He et al^[5] 研究确定浓度) 和 ML385 (5 mmol/L) 分别预处理 VSMC 24 h, 然后用 H₂O₂ 0.5 mmol/L 处理 12 h, 收获 VSMC 用于后续实验。

1.7 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测谷氨酸-半胱氨酸催化亚基 (glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, GCLC)、NAD(P)H 醌脱氢酶 1 [NAD(P)H quinone dehydrogenase 1, NQO-1]、超氧化物歧化酶 1 (superoxide dismutase 1, SOD1)、 α -SMA、SM22 α mRNA 水平。使用 TRIzol 试剂从 VSMC 或脑动脉中提取总 RNA, 然后反转录成 cDNA, 进行实时 PCR, 引物序列见表 1。使用 β -actin 作为内参, 使用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算相对 mRNA 水平。

表 1 引物序列

基因	引物序列 (5'-3')
SOD-1	上游: CCTCGGCAACGTGACTGCTA
	下游: ACTTGGCTATTCGATGACACC
GCLC	上游: GATGCCATCTAGCTCTAGCACATAGC
	下游: CCGCTCGAGCCCAATTCGGCTTATG
NQO-1	上游: ACGGCGATGAGACGATG
	下游: CTGAAACCCGACAGAGT
α -SMA	上游: AGTCGCCATCAGGAACCTCGAG
	下游: ATCTTTTCATGTCGTCGCCAGTTG
SM22 α	上游: TTCTGCCTCAACATGGCCAAAC
	下游: CACCTTCACTGGCTTGGATC
GAPDH	上游: TGCCTCCTGCACCACCAACT
	下游: CGCCTGCTTACCACCTTC

1.8 核质分离 按照 1.6 项分组处理细胞后, 用胰蛋白酶消化收获 VSMC, 用 PBS 洗涤, 并通过离心沉淀。根据制造商的说明, 使用 NE-PER 核和细胞质提取试剂从细胞中制备核和细胞质提取物。蛋白质水平以相对于 Lamin B1 (核组分内参) 或 β -actin (质组分内参) 的相对比值进行测量。

1.9 Western blot 检测蛋白表达 RIPA 裂解液提取 VSMC 中总蛋白, BCA 测定总蛋白浓度。每孔上样量 40 μ g, 用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并电转至 PVDF 膜, 室温下用 5% 脱脂奶粉液封闭膜 2 h, 加入一抗 Nrf2 (1:500)、Lamin B1

(1 : 1 000)、 β -actin(1 : 1 000)、 α -SMA (1 : 200)、SM22 α (1 : 250)、MMP-2 (1 : 1 000)、MMP-9 (1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜,加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1 : 3 000) 和兔抗小鼠 IgG (HRP) (1 : 2 000) 室温孵育 2 h,洗膜,ECL 发光显色,拍照。采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

1.10 ELISA 检测 VSMC 中细胞因子水平 按照 1.6 项分组处理细胞后,1 062 r/min 离心 5 min,收集细胞上清液,按照试剂盒说明书操作,检测 IL-1 β 、IL-6、MCP-1 和 TNF- α 含量。

1.11 流式检测细胞凋亡 按照 1.6 项分组处理细胞后,收集细胞,用 PBS 洗涤,再悬浮在 100 ml 结合缓冲液中。然后用 Annexin V 和 PI 在黑暗中孵育 10 min,用流式细胞仪进行分析。

1.12 DCFH-DA 荧光染色检测活性氧(reactive oxygen species ROS)产生 将细胞以 1×10^5 个/孔密度接种在 6 孔板中,按照 1.6 项分组处理细胞后,加入 DCFH-DA 荧光探针(1 : 1 000),将细胞在 37 °C 下孵育 1 h。然后,用无血清 DMEM 洗涤 VSMC 3 次并悬浮在 PBS 中。在流式细胞仪 488 nm (激发)和 525 nm(发射)的波长下测量 DCFH 的荧光强度。

1.13 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计量资料以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用对数秩检验分析 Kaplan - Meier 曲线,以确定生存曲线之间存在统计学意义;多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 灯盏花素可以防止大鼠模型中 IA 的形成和破裂 在假手术组中,Nrf2 表达主要在细胞质中,IA 大鼠 Nrf2 表达下调且转移至细胞核中,Bre 治疗后 Nrf2 在核内表达增多。HE 结果显示,假手术组未发现动脉内膜、VSMC 和外膜损伤,并且细胞排列整齐,结构完整。模型组大鼠内膜受损,VSMC 数量和层数减少,动脉壁变薄,弹性纤维断裂和炎性细胞浸润。Bre 治疗减轻 IA 大鼠的病理损伤和炎性细胞浸润程度,见图 1A。与假手术组比较,模型组 IA 发生率(14 vs 0)升高($P < 0.01$),生存率降低,收缩压升高($P < 0.01$);与模型组相比,Bre 组的 IA 发生率(12 vs 14)降低($P < 0.01$),见图 1B,生存率改善($P < 0.01$),见图 1C,收缩压降低($P < 0.01$),见图 1D。

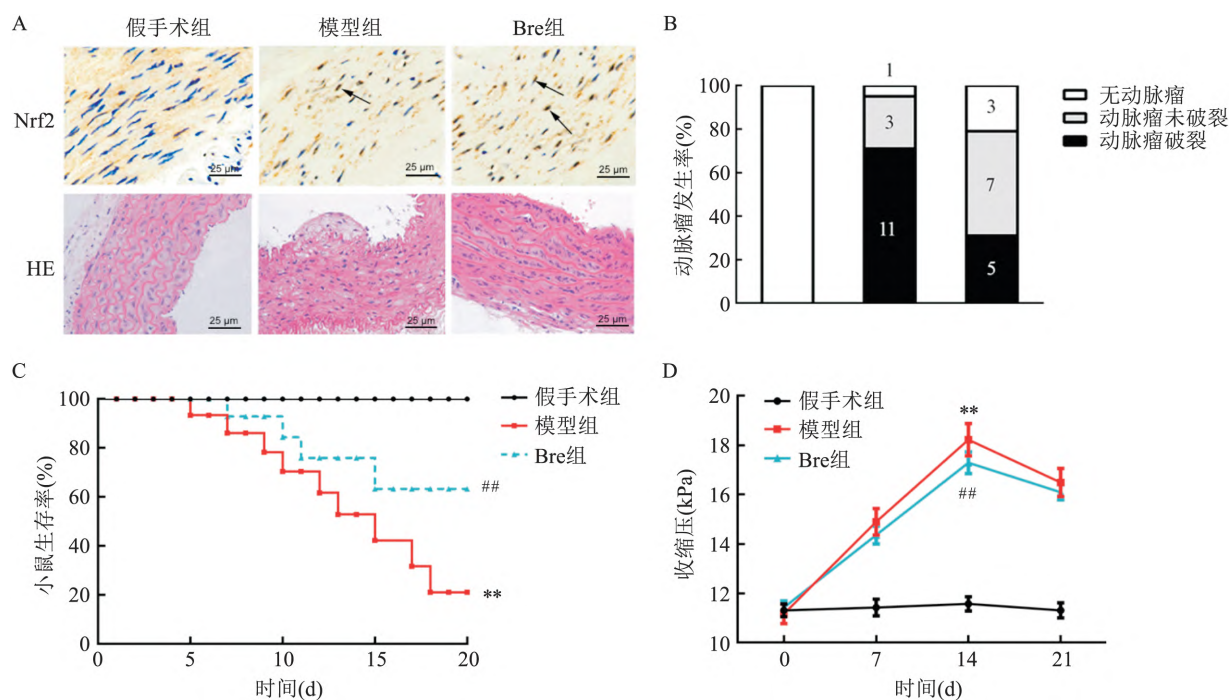


图1 灯盏花素可以防止大鼠模型中 IA 的形成和破裂

A: Nrf2 免疫组化和 HE 染色 $\times 400$; B: 颅内动脉瘤发生率; C: 各组大鼠生存率; D: 各组大鼠收缩压; 与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

2.2 灯盏花素恢复 IA 大鼠中收缩相关基因的表达 如图 2 所示,与假手术组比较,模型组脑动脉瘤中 α -SMA 和 SM22 α 荧光密度降低 ($t = 36.63, P < 0.01$; $t = 23.73, P < 0.01$), α -SMA 和 SM22 α mRNA 水平 ($t = 23.90, P < 0.01$; $t = 23.70, P < 0.01$) 和蛋白表达水平 ($t = 34.08, P < 0.01$; $t = 31.52, P < 0.05$) 均下调;与模型组比较,Bre 预处理增加 α -SMA 和 SM22 α 的荧光密度 ($t = 25.36, P < 0.01$; $t = 23.63, P < 0.01$),上调 α -SMA 和 SM22 α mRNA 水平 ($t = 15.45, P < 0.01$; $t = 13.51, P < 0.01$) 和蛋白表达水平 ($t = 7.40, P < 0.01$; $t = 8.52, P < 0.05$)。

2.3 在 H_2O_2 诱导的 VSMC 中灯盏花素可激活

Nrf2 途径 如图 3 所示,在 H_2O_2 处理后,VSMC 中的核 Nrf2 表达上调 ($t = 5.04, P < 0.05$),胞质 Nrf2 表达下调 ($t = 5.71, P < 0.01$),Bre 预处理 VSMC 上调核 Nrf2 表达 ($t = 13.51, P < 0.01$),下调胞质 Nrf2 表达 ($t = 6.28, P < 0.01$)。与假手术组比较,虽然模型组表现出 SOD-1、GCLC 和 NQO1 mRNA 水平的升高,但 Bre 组表现出更高的上调 ($F = 231.50, P < 0.01$; $F = 101.60, P < 0.01$; $F = 61.34, P < 0.01$)。

2.4 灯盏花素通过 Nrf2 途径抑制 H_2O_2 诱导的 VSMC 表型切换和促炎细胞因子的产生 如图 4 所示, H_2O_2 处理下调 VSMC 中 α -SMA 和 SM22 α 的表达 ($t = 25.25, P < 0.01$; $t = 34.08, P < 0.01$),上调

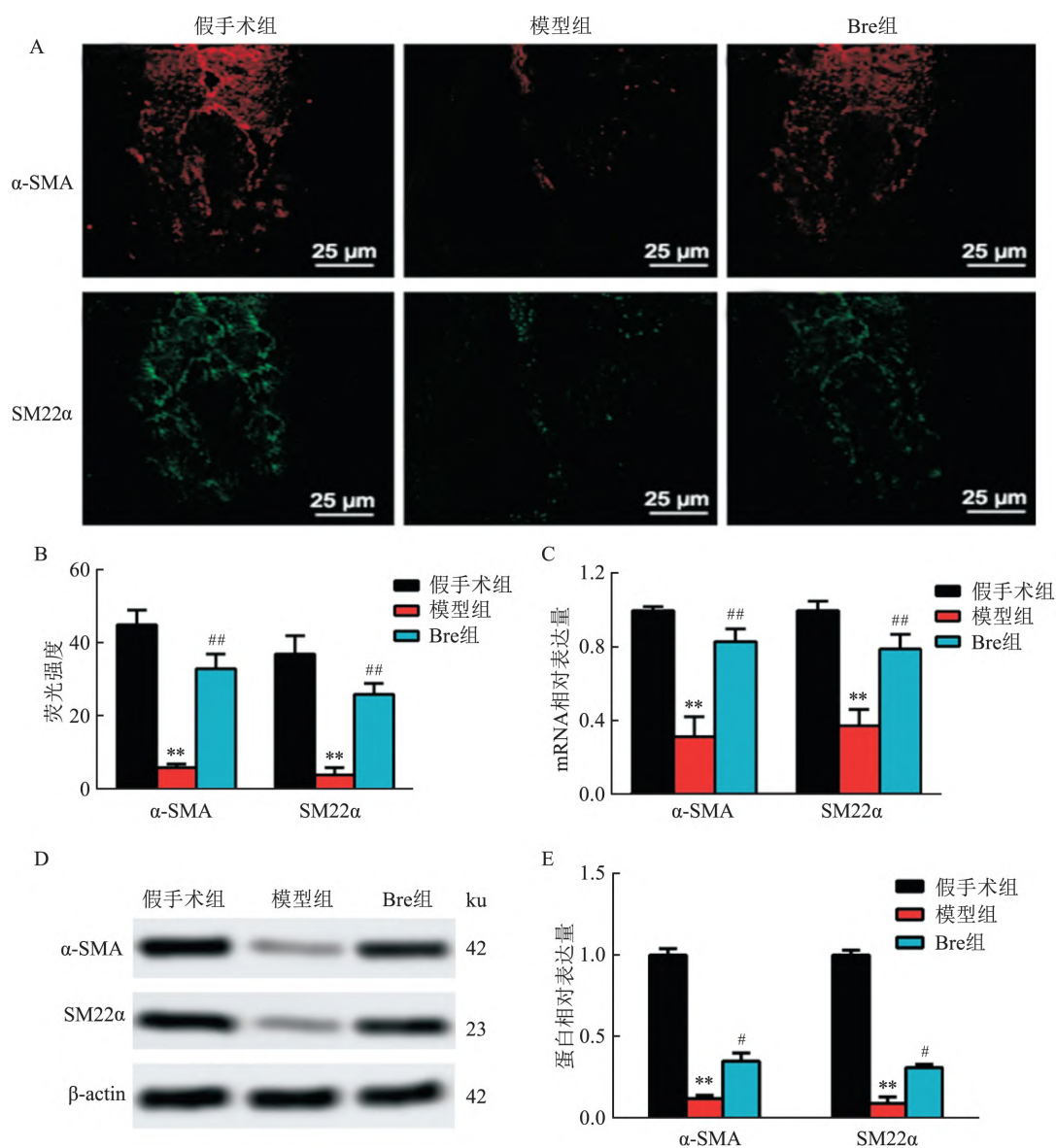


图2 灯盏花素对 IA 大鼠中收缩相关基因表达的影响

A: 免疫荧光染色检测 α -SMA 和 SM22 α 表达 $\times 400$; B: 荧光强度统计; C: α -SMA 和 SM22 α mRNA 水平; D: Western blot 检测 α -SMA 和 SM22 α 蛋白表达; E: 蛋白相对表达量; 与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

MMP-2 和 MMP-9 的表达 ($t = 24.58, P < 0.01; t = 20.75, P < 0.01$); Bre 预处理组上调 VSMC 中 α -SMA 和 SM22 α 的表达 ($t = 11.28, P < 0.01; t = 13.80, P < 0.01$), 下调 MMP-2 和 MMP-9 的表达 ($t = 18.73, P < 0.01; t = 17.23, P < 0.01$); 抑制 Nrf2

可逆转 Bre 的治疗作用。如表 2 所示, H_2O_2 处理的 VSMC 中炎症因子含量增加, Bre 预处理降低了 H_2O_2 诱导的高炎症因子水平; 抑制 Nrf2 减弱了 Bre 的抗炎效果。

2.5 灯盏花素通过 Nrf2 途径抑制 H_2O_2 诱导的

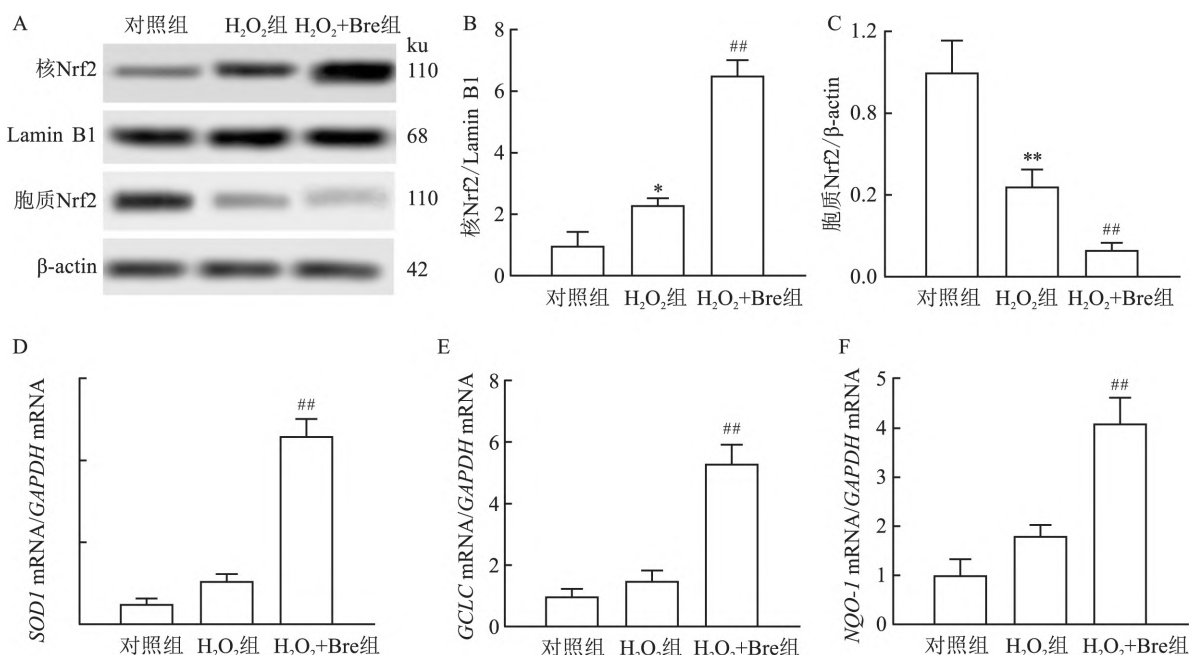


图3 灯盏花素对 Nrf2 途径的影响

A: Western blot 检测各组核 Nrf2 和胞质 Nrf2 的表达; B: 核 Nrf2 蛋白相对表达量; C: 胞质 Nrf2 蛋白相对表达量; D: SOD1 转录水平; E: GCLC 转录水平; F: NQO1 转录水平; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 H_2O_2 组比较: ## $P < 0.01$

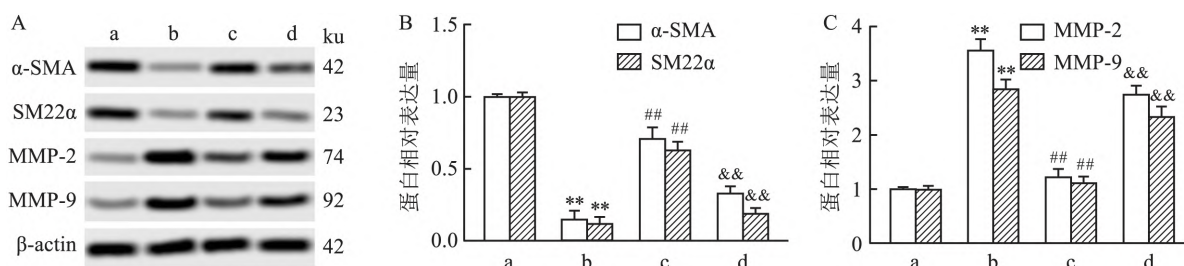


图4 灯盏花素通过 Nrf2 途径对 H_2O_2 诱导的 VSMC 损伤的影响

A: Western blot 检测各组 α -SMA、SM22 α 、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达; B: α -SMA 和 SM22 α 蛋白相对表达量; C: MMP-2 和 MMP-9 蛋白相对表达量; a: 对照组; b: H_2O_2 组; c: H_2O_2 + Bre 组; d: H_2O_2 + Bre + ML385 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 H_2O_2 组比较: ## $P < 0.01$; 与 H_2O_2 + Bre 组比较: && $P < 0.01$

表2 ELISA 法检测 VSMC 细胞中促炎因子水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	MCP-1 (pg/ml)	TNF- α (ng/ml)	IL-1 β (ng/ml)	IL-6 (pg/ml)
对照	34.35 $\pm$ 5.23	1.35 $\pm$ 0.41	49.38 $\pm$ 7.11	71.68 $\pm$ 15.43
H_2O_2	87.72 $\pm$ 9.31 **	4.31 $\pm$ 1.25 **	118.54 $\pm$ 16.42 **	169.51 $\pm$ 22.78 **
H_2O_2 + Bre	54.57 $\pm$ 6.44 ##	2.44 $\pm$ 0.47 ##	80.47 $\pm$ 10.96 ##	123.76 $\pm$ 17.23 ##
H_2O_2 + Bre + ML385	73.81 $\pm$ 7.23 &&	3.67 $\pm$ 1.16 &&	97.68 $\pm$ 12.47 &&	143.17 $\pm$ 18.05 &&
F 值	31.17	6.29	17.23	14.90
P 值	0.000	0.017	0.001	0.001

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 H_2O_2 组比较: ## $P < 0.01$; 与 H_2O_2 + Bre 组比较: && $P < 0.01$

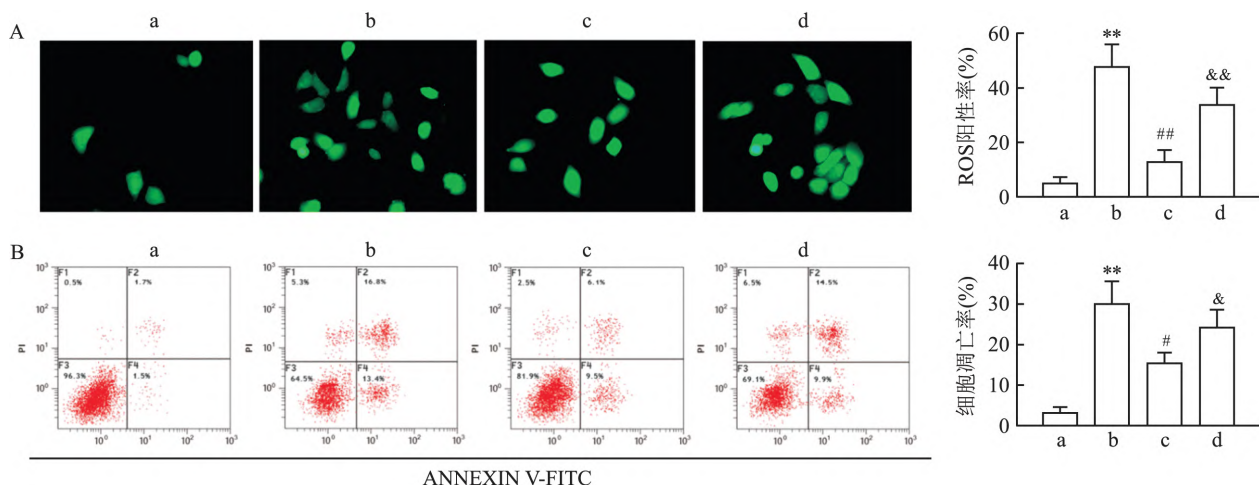


图5 灯盏花素通过 Nrf2 途径对 H₂O₂ 诱导的 ROS 产生和 VSMC 凋亡的影响

A: DCFH-DA 染色检测 ROS 的产生 $\times 400$; B: 流式检测细胞凋亡; a: 对照组; b: H₂O₂ 组; c: H₂O₂ + Bre 组; d: H₂O₂ + Bre + ML385 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 H₂O₂ 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 H₂O₂ + Bre 组比较: & $P < 0.05$, && $P < 0.01$

ROS 产生和 VSMC 凋亡 如图 5 所示,在 H₂O₂ 处理的 VSMC 中 ROS 的产生较高 ($t = 9.03$, $P < 0.01$),Bre 预处理降低了 ROS 的产生 ($t = 6.78$, $P < 0.01$)。H₂O₂ 处理导致 VSMC 凋亡率增加 ($t = 8.42$, $P < 0.01$),Bre 预处理降低了 H₂O₂ 诱导的凋亡 ($t = 4.31$, $P < 0.05$)。此外,Nrf2 被抑制时减弱了 Bre 对 H₂O₂ 处理的 VSMC 细胞 ROS 产生和凋亡的抑制作用 ($P < 0.01$)。

3 讨论

IA 是一种脑血管疾病,具有很高的病死率和发病率。IA 病理过程包括内部弹性层板的破坏、VSMC 表型的转换和细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的重塑^[9]。既往研究^[10]表明 Nrf-2 信号途径通过调节 VSMC 表型和功能来抑制颅内动脉瘤形成和进展。在本研究中,通过注射弹性蛋白酶到基底池建立的 IA 大鼠动脉瘤壁中 Nrf2 的表达减少,且 VSMC 发生病变和炎性细胞浸润。Bre 上调 Nrf2 的表达,减轻 VSMC 的病理损伤,降低大鼠 IA 的发生和破裂,增加大鼠生存率。此外,Bre 上调 IA 大鼠脑动脉瘤中收缩表型标志物 SM22 α 和 α -SMA 的表达^[11],提示 VSMC 表型恢复正常。因此上述结果表明,Bre 在颅内动脉瘤的形成和发展中起到保护作用,其机制可能与 Nrf2 的高表达有关。

既往研究^[12]表明 Nrf2 是主要的内源性抗氧化系统之一,在正常生理条件下,ke1ch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH associating protein1, Keap1) 与 Nrf2 在细胞质中结合。在应激条件下,Nrf-2 从细胞

质转到细胞核,调节抗氧化和抗炎基因的表达^[13]。Nrf-2 途径的激活在 IA 中具有抗氧化应激和防止 VSMC 表型切换的保护作用^[14]。Liu et al^[15] 研究发现 Bre 在 CCl₄ 诱导的急性肝损伤中可通过激活 Nrf2 途径及下游抗氧化酶、减少 ROS 产生和抑制炎症反应。本研究结果表明 Bre 可上调 H₂O₂ 处理的 VSMC 中核 Nrf2 的表达并增加下游抗氧化酶转录水平,减少 ROS 的产生和细胞凋亡,并抑制 VSMC 中炎性细胞因子的分泌。而加入 Nrf2 抑制剂减弱了 Bre 的抗炎、抗氧化和恢复 VSMC 收缩表型作用。因此,Bre 通过激活 Nrf2 途径减轻 H₂O₂ 诱导的 VSMC 氧化损伤和表型转换。

综上所述,本研究表明 Bre 通过改善大鼠动脉壁病理损伤、IA 发生率和存活率起到有效保护作用。体外研究表明 Bre 能够激活 Nrf2 信号,促进抗氧化酶的表达,抑制促炎性细胞因子、ROS 的产生和细胞凋亡。

参考文献

- [1] Toth G, Cerejo R. Intracranial aneurysms: Review of current science and management [J]. Vasc Med, 2018, 23(3): 276-88.
- [2] Tan X, Li T, Zhu S, et al. Induction of SPARC on oxidative stress, inflammatory phenotype transformation, and apoptosis of human brain smooth muscle cells via TGF- β 1-NOX4 pathway [J]. J Mol Neurosci, 2020, 70(11): 1728-41.
- [3] 王少华,孙凡凡,薛威,等. 灯盏花素调控 NLRP3 炎症小体活化抑制慢性脑缺血大鼠神经元细胞焦亡与凋亡作用 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(9): 1321-6.
- [4] Jiang L, Hu Y, He X, et al. Brevicapsin reduces neuronal injury caused by traumatic brain injury insult: partly associated with suppression of interleukin-6 expression [J]. Neural Regen Res,

- 2017, 12(1): 90–5.
- [5] He M, Xue Z M, Li J, et al. Breviscapine inhibits high glucose-induced proliferation and migration of cultured vascular smooth muscle cells of rats *via* suppressing the ERK1/2 MAPK signaling pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(5): 606–14.
- [6] Li Y, Li S, Li D. Breviscapine alleviates cognitive impairments induced by transient cerebral ischemia/reperfusion through its anti-inflammatory and anti-oxidant properties in a rat model[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2020, 1(24): 4489–98.
- [7] Li F, Wang X, Zhang Z, et al. Breviscapine provides a neuroprotective effect after traumatic brain injury by modulating the Nrf2 signaling pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 14899–907.
- [8] Huang J, Zhang H, You L, et al. Coenzyme Q10 inhibits intracranial aneurysm formation and progression in a mouse model[J]. *Pediatr Res*, 2021, doi: 10.1038/s41390-021-01512-8.
- [9] Liu P, Song Y, Zhou Y, et al. Cyclic mechanical stretch induced smooth muscle cell changes in cerebral aneurysm progress by reducing collagen type IV and collagen type VI levels[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(3): 1051–60.
- [10] Shi Y, Li S, Song Y, et al. Nrf-2 signaling inhibits intracranial aneurysm formation and progression by modulating vascular smooth muscle cell phenotype and function[J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 185.
- [11] 胡露露, 艾琦, 胡晓燕, 等. TGF- β 1 介导人乳牙牙髓干细胞分化为血管平滑肌细胞的研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(3): 338–43.
- [12] 李艳红, 雷小林, 张乙川, 等. 腺苷蛋氨酸联合糖皮质激素治疗胆汁淤积性肝病的临床效果及对血清 Nrf2、Ho-1 水平的影响[J]. *临床误诊误治*, 2020, 33(9): 29–33.
- [13] 苏小明, 王岳杨, 徐铭晨, 等. 五味子丙素对 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞衰老作用的影响及机制[J]. *解放军医学杂志*, 2021, 46(3): 221–30.
- [14] Pascale C L, Martinez A N, Carr C, et al. Treatment with dimethyl fumarate reduces the formation and rupture of intracranial aneurysms: Role of Nrf2 activation[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2020, 40(5): 1077–89.
- [15] Liu Y, Wen P H, Zhang X X, et al. Breviscapine ameliorates CCl_4 induced liver injury in mice through inhibiting inflammatory apoptotic response and ROS generation[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(2): 755–68.

Breviscapine inhibits the formation and mechanism of intracranial aneurysms by regulating the Nrf2 pathway

Ai Qiyuan, Wang Yong, Xu Ruichun, Peng Zhen, Li Jinsong

(Dept of Neurosurgery, The Third Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Duiyun 558000)

Abstract Objective To explore the effect and mechanism of breviscapine (Bre) on the formation of intracranial aneurysm (IA) and its influence on nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) pathway in a rat model.

Methods The rat model of IA was established by elastase injection. The rats were randomly divided into Sham group, Model group and Bre group with 15 rats in each group. The Bre group was intraperitoneally injected with 50 mg/kg Bre every day, the Sham group and Model group were intraperitoneally injected with the same volume of normal saline for 3 weeks. During this period, the incidence of IA, survival rate and systolic blood pressure were recorded, immunofluorescence staining and qRT-PCR were employed to assay the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) and smooth muscle 22 α (SM22 α). Hydrogen peroxide (H_2O_2 , 0.5 mmol/L) was used to treat rat vascular smooth muscle cells (VSMC) to induce oxidative damage, and then co-incubated with Bre (100 μ mol/L) or/and ML385 (Nrf2 inhibitor), Western blot, qRT-PCR, ELISA, DCFH-DA fluorescence staining and flow cytometry were used to detect the expression of Nrf2, contractile phenotype-related protein and inflammatory cytokine, reactive oxygen species (ROS) production and cell apoptosis rate, respectively.

Results In IA rats, Bre treatment up-regulated the expression of nuclear Nrf2, improved the pathological changes of IA, reduced the incidence of IA, improved the survival rate, and lowered the systolic blood pressure. In VSMC treated with H_2O_2 , Bre pretreatment increased the expression of Nrf2, antioxidant enzymes, α -SMA and SM22 α , reduced the expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2 and MMP-9, the production of ROS and cell apoptosis, and reduced inflammation in cerebral arteries cell infiltration and expression of pro-inflammatory cytokines. Inhibition of Nrf2 weakened the therapeutic effect of Bre pretreatment in H_2O_2 treated VSMC.

Conclusion Bre can effectively reduce the oxidative stress and inflammation in VSMC, thereby reducing the formation and rupture of IA in rat. The mechanism may be related to the activation of the Nrf2 pathway.

Key words intracranial aneurysm; breviscapine; α -smooth muscle actin; nuclear factor erythroid 2 related factor 2; vascular smooth muscle cells