基于Nrf2/HO-1信号通路探讨虾青素对创伤性脑损伤模型大鼠氧化应激和炎症反应的影响Δ

易宇光*,刘昌平,何佳佳(萍乡市第二人民医院神经外科,江西 萍乡 337000)

中图分类号 R965;R651.1+5 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408(2023)20-2490-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.20.08

摘 要 目的 探讨虾青素对创伤性脑损伤(TBI)大鼠氧化应激和炎症反应的影响。**方法** 将雄性SD大鼠分为假手术组、模型组、虾青素低剂量组(20 mg/kg)、虾青素高剂量组(40 mg/kg)、虾青素+ML385组[虾青素40 mg/kg+核转录因子红系2相关因子2(Nrf2)抑制剂ML385 30 mg/kg],每组14只。除假手术组外,其余各组大鼠按改良的Feeney自由落体撞击法复制TBI大鼠模型。各药物组大鼠灌胃或腹腔注射相应药液,假手术组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水。分别于药物干预后第1、3、7天对各组大鼠的神经功能进行评分;于药物干预后第7天,观察各组大鼠脑组织形态学变化并进行炎症浸润评分,观察其脑组织神经细胞超微结构,检测脑组织中氧化应激指标[超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)]、炎症反应指标[肿瘤坏死因子α、白细胞介素1β(IL-1β)、IL-6、诱导型一氧化氮合酶]含量和Nrf2、血红素加氧酶1(HO-1)、NAD(P)H醌氧化还原酶1(NQO1)蛋白及mRNA的表达情况。**结果** 与假手术组比较,模型组大鼠脑组织水肿明显并伴有大量炎症细胞浸润,神经细胞的细胞器形态受损、数量减少且超微结构破损严重;其神经功能评分,脑组织中SOD、CAT、GSH-Px、NO含量和Nrf2、HO-1、NQO1蛋白及mRNA的相对表达水平均显著降低,炎症浸润评分、MDA含量和炎症反应指标含量均显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,低、高剂量虾青素可显著改善脑组织及神经细胞的病理状态和神经功能评分(虾青素低剂量组药物干预第1天除外),可剂量依赖性地升高脑组织中SOD、CAT、GSH-Px、NO含量和Nrf2、HO-1、NQO1蛋白及mRNA的相对表达水平,降低炎症浸润评分、MDA含量和炎症反应指标含量($P<0.05$);而ML385可显著抑制虾青素的上述作用($P<0.05$)。**结论** 虾青素可能通过激活Nrf2/HO-1信号通路而减轻TBI大鼠的氧化应激,缓解其神经功能损伤,降低炎症反应水平。

关键词 虾青素;创伤性脑损伤;氧化应激;炎症反应;核转录因子红系2相关因子2/血红素加氧酶1信号通路

Effects of astaxanthin on oxidative stress and inflammatory reaction in rats with traumatic brain injury based on Nrf2/HO-1 signaling pathway

YI Yuguang, LIU Changping, HE Jiajia (Dept. of Neurosurgery, Pingxiang Second People's Hospital, Jiangxi Pingxiang 337000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To investigate the effects of astaxanthin on oxidative stress and inflammatory reaction in rats with traumatic brain injury (TBI). **METHODS** Male SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, astaxanthin low-dose group (20 mg/kg), astaxanthin high-dose group (40 mg/kg), astaxanthin+ML385 group [astaxanthin 40 mg/kg+ nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) inhibitor ML385 30 mg/kg], with 14 rats in each group. Except for the sham operation group, TBI model was induced by the modified Feeney free-fall impact method in other groups. The rats in each drug group were given the corresponding drug intragastrically or intraperitoneally, and the rats in the sham operation group and model group were intragastrically given a constant volume of normal saline. The neurological function of rats in each group was scored on the 1st, 3rd and 7th day after drug intervention; on the 7th day of drug intervention, the changes of cerebral histomorphology and inflammatory infiltration score were observed in each group, and the ultrastructure of nerve cells in brain tissue was also observed. The contents of oxidative stress indexes [superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO)] and inflammatory reaction indexes [tumor necrosis factor-α, interleukin-1β (IL-1β), IL-6, inducible nitric oxide synthase] as well as protein and mRNA expressions of Nrf2, heme oxygenase-1 (HO-1) and NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) were detected in cerebral tissue. **RESULTS** Compared with the sham operation group, the brain edema of rats in the model group was obvious, accompanied by a large number of inflammatory cells infiltrated, the shape of organelles was damaged and their number was reduced, and the ultrastructure of nerve cells was seriously damaged. The neurological function score, the contents of SOD, CAT, GSH-Px and NO and the relative expression levels of Nrf2, HO-1 and NQO1 protein and mRNA in brain tissue were significantly decreased, while the inflammatory infiltration scores, the contents of MDA and inflammatory reaction indexes were

Δ**基金项目** 江西省卫生健康委科技计划项目(No.202311739)

*第一作者 副主任医师。研究方向:神经外科脑外伤及脑血管疾病。电话:0799-6865427。E-mail:yyuguang2145@163.com

significantly increased ($P<0.05$). Compared with the model group, low-dose and high-dose astaxanthin could significantly improve the pathological status of brain tissue and nerve cells and neurological function scores (except for the first day of drug intervention in the astaxanthin low-dose group), increase the contents of SOD, CAT, GSH-Px and NO and the relative expression levels of Nrf2, HO-1, NQO1 protein and mRNA in brain tissue in a dose-dependent manner, and reduce inflammatory infiltration scores, the contents of MDA and inflammatory reaction indexes ($P<0.05$). ML385 could significantly inhibit the above effects of astaxanthin ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Astaxanthin may reduce the oxidative stress of TBI model rats, alleviate the neurological damage and reduce the level of inflammation reaction by activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway.

KEYWORDS astaxanthin; traumatic brain injury; oxidative stress; inflammatory reaction; Nrf2/HO-1 signaling pathway

创伤性脑损伤（traumatic brain injury，TBI）是神经外科常见疾病之一，发病率高[1]。当创伤事件造成脑部原发性机械损伤后，患者脑组织中氧自由基和多种细胞因子表达出现异常，从而导致神经细胞结构受损，并造成脑损伤后神经细胞继发死亡，最终导致患者残疾甚至死亡，严重影响其生存质量[2]。目前，针对TBI的有效治疗药物较为匮乏，因此深入探讨TBI病理机制，寻找新的、有效的脑保护药物具有重要意义。

多种中药提取物及活性成分对TBI具有潜在的改善作用，如广泛存在于海洋生物体内的虾青素，具有强抗氧化、抗炎、抗凋亡等作用[3]。虾青素属类胡萝卜素类成分，可透过血脑屏障，对神经系统疾病具有积极的干预作用；同时，该成分可改善缺血缺氧性脑损伤大鼠的预后，具有神经保护作用[4－5]。研究发现，氧化应激是引起TBI的重要因素[6]。核转录因子红系2相关因子2（nuclear factor-erythroid 2-related factor 2，Nrf2）/血红素加氧酶1（heme oxygenase-1，HO-1）信号通路是机体内重要的抗氧化应激通路，其中Nrf2是氧化应激的中枢调节因子，可在氧化应激状态下激活下游HO-1等抗氧化因子的转录和表达，从而发挥对氧化应激损伤的改善作用[7]。研究表明，虾青素可通过调节Nrf2/HO-1信号通路来缓解多种疾病的氧化应激和炎症反应，从而发挥器官保护作用[8－9]。本研究旨在探讨虾青素对TBI模型大鼠氧化应激和炎症反应的影响，并基于上述通路探讨其可能机制，为该成分的进一步开发和应用提供理论基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括EnSight型多功能酶标仪（上海玮驰仪器有限公司）、Axio Scope A1型光学显微镜（德国Carl Zeiss公司）、H-7650型透射电镜（日本Hitachi公司）、ABI 7500型定量聚合酶链式反应（PCR）仪（美国Applied Biosystems公司）、Amersham Imager 600RGB型超灵敏多功能成像仪（美国GE Healthcare公司）等。

1.2 主要药品与试剂

虾青素对照品（批号A832359，纯度≥98%）购自上海麦克林生化科技股份有限公司；Nrf2抑制剂ML385对照品（批号HY-100276，纯度≥98%）购自美国MCE公司；肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）、IL-6、诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase，iNOS）酶联免疫吸附测定（ELISA）试剂盒（批号分别为HAS-48611、HAS-47926、HAS-47902、HAS-48231）均购自深圳海思安生物技术有限公司；过氧化氢酶（catalase，CAT）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase，GSH-Px）、一氧化氮（nitric oxide，NO）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）试剂盒（批号分别为20220827、20220807、20220814、20220829、20220816）均购自南京建成生物工程研究所；荧光定量PCR试剂盒（批号DRR137A）购自宝生物工程（大连）有限公司；兔抗大鼠Nrf2、HO-1、NAD（P）H醌氧化还原酶1[NAD（P）H：quinone oxidoreductase 1，NQO1]、β-肌动蛋白（β-actin）一抗和辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗兔IgG二抗（批号分别为ab158523、ab189491、ab80588、ab210319、ab203875）均购自英国Abcam公司；ECL发光试剂盒（批号170-5031）购自上海翌圣生物科技有限公司。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠75只，10～12周龄，购自成都药康生物科技有限公司，动物使用许可证号为SYXK（川）2020-0034。所有动物均饲养于温度20～25 ℃、相对湿度40%～70%、每12 h昼夜交替并定期以紫外线消毒的动物房内，适应性喂养1周后进行后续实验。本研究方案经萍乡市第二人民医院动物实验伦理委员会审批通过，批件号为2022007。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

采用改良Feeney自由落体撞击法复制TBI大鼠模型：大鼠经麻醉后固定于立体定位仪上，剪毛消毒后沿矢状缝切开头皮，露出右顶骨后行颅骨钻孔术，打开直径约4 mm的骨窗并保持硬脑膜完整；用40 g砝码从40 cm高处自由落体撞击，造成大鼠右侧大脑半球脑损伤，以出现短暂呼吸暂停、四肢抽搐为造模成功[10]。造模前，选择14只大鼠作为假手术组，仅开骨窗但不撞击。剔除造模未成功和死亡的大鼠（分别为3、2只），将造模成

功的大鼠随机分为模型组、虾青素低剂量组（20 mg/kg）、虾青素高剂量组（40 mg/kg）、虾青素+ML385组（40 mg/kg虾青素+30 mg/kg ML385），每组14只。虾青素用二甲基亚砜溶解并用生理盐水稀释，配制成2、4 g/L的药液，以10 mL/kg灌胃；ML385用二甲基亚砜溶解并用生理盐水稀释，配制成3 g/L的药液，以10 mL/kg腹腔注射。虾青素低、高剂量组大鼠分别灌胃20、40 mg/kg的虾青素；虾青素+ML385组大鼠在灌胃40 mg/kg虾青素的同时腹腔注射30 mg/kg的ML385；假手术组和模型组大鼠灌胃等体积的生理盐水（含二甲基亚砜）；每天1次，连续7 d。虾青素的成人日推荐摄取量为4～50 mg[11]，按人与大鼠体表面积比换算得大鼠等效剂量为20 mg/kg，以此作为低剂量，其2倍作为高剂量。ML385的剂量参考相关文献[12]设置。

2.2 大鼠神经功能评估

分别于药物干预后第1、3、7天，应用Garcia评分对各组大鼠的神经功能缺损程度进行评估。最高分为18分，评分越低表示神经功能缺损越严重[13]。

2.3 大鼠脑组织形态学变化观察及炎症浸润评分

药物干预后第7天，各组取4只大鼠处死，提取其脑组织并保存于－80 ℃冰箱中，待用。取上述大鼠的损伤区脑组织（假手术组取相同位置脑组织）适量，用4%多聚甲醛溶液固定后，行常规石蜡包埋、切片，经苏木精-伊红（HE）染色后使用显微镜观察其脑组织形态学变化情况，并进行炎症浸润评分，具体标准如下：无炎症细胞浸润，记0分；有少量散在炎症细胞浸润，记1分；小血管周围可见“血管套”结构，记2分；可见大面积广泛炎症细胞浸润，记3分[14]。

2.4 大鼠脑组织神经细胞超微结构观察

取“2.3”项下各大鼠余下缺损区脑组织（假手术组取相同位置脑组织），切成2 mm厚的组织块，于2.5%戊二醛电镜固定液中静置6 h，然后用磷酸盐缓冲溶液冲洗，再用1%四氧化锇磷酸缓冲液固定，行丙酮脱水、环氧树脂618原位包埋、切片，经枸橼酸铅和醋酸双氧铀染色后使用透射电镜观察并拍照，记录其脑组织神经细胞超微结构改变情况。

2.5 大鼠脑组织氧化应激和炎症反应相关指标检测

末次给药1 h后，处死各组剩余10只大鼠，取其损伤区脑组织（假手术组取相同位置脑组织）适量，制备脑组织匀浆，通过化学比色法检测大鼠脑组织中氧化应激指标（SOD、CAT、GSH-Px、MDA、NO）的含量，通过ELISA法检测其脑组织中炎症反应指标（TNF-α、IL-1β、IL-6、iNOS）的含量。上述操作均严格按照相应试剂盒说明书执行。

2.6 大鼠脑组织中Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA表达水平检测

采用实时PCR（real-time PCR，RT-PCR）法进行检测。取“2.5”项下各大鼠损伤区脑组织（假手术组取相同位置脑组织）适量，采用Trizol法提取总RNA，检测RNA浓度后将其反转录为cDNA。以上述cDNA为模板，进行PCR扩增，严格按照相应试剂盒说明书操作。反应体系包括：10×PCR缓冲液2.5 μL，dNTP混合液3 μL，上、下游引物各0.5 μL，cDNA模板1 μL，TaqDNA聚合酶1 μL，Mg^{2+} 1.5 μL，加水（经焦碳酸二乙酯处理）至25 μL。反应条件如下：94 ℃预变性1 min；95 ℃变性30 s，55 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，40个循环；最后72 ℃再延伸5 min。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA的相对表达水平。Nrf2的上、下游引物分别为5′-TCAGCGACTGTCACTCGATGA-3′、5′-CCACTGGTCGTGGAGTGGATG-3′；HO-1的上、下游引物分别为5′-GGGTCGTCAGTACCAGTTTC-3′、5′-CCAGGCATCGGCAGCAATTC-3′；NQO1的上、下游引物分别为5′-ATCCTGCGCTACTGCGACTT-3′、5′-GCATGCTAGAGTGTTCTCTCCT-3′；GAPDH的上、下游引物分别为5′-CTCGCTTCTGAAGCACA-3′，5′-AACGCTGCTCGAATTTGCGT-3′。

2.7 大鼠Nrf2/HO-1信号通路相关蛋白表达水平检测

采用Western blot法进行检测。取“2.5”项下各大鼠损伤区脑组织（假手术组取相同位置脑组织）适量，加入RIPA裂解液提取总蛋白，于沸水中加热10 min变性；取变性蛋白适量，经电泳分离后转移至聚偏二氟乙烯膜上，以5%脱脂奶粉封闭1 h；用TBST缓冲液清洗2 min×3次，加入Nrf2、HO-1、NQO1、β-actin一抗（稀释比例均为1∶1 000），4 ℃孵育过夜；用TBST缓冲液清洗2 min×3次，加入相应二抗（稀释比例为1∶2 000），室温孵育1 h；用TBST缓冲液清洗2 min×3次，加入ECL显色，置于多功能成像仪下成像，并采用Image J 5.0软件进行分析，以目的蛋白与内参蛋白（β-actin）的灰度值比值表示各目的蛋白的相对表达水平。

2.8 统计学方法

采用SPSS 21.0软件对数据进行统计分析。计量资料用$\bar{x} \pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 各组大鼠的神经功能评分

与假手术组比较，模型组大鼠第1、3、7天时的神经功能评分均显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，虾青素高剂量组大鼠在药物干预第1天时和虾青素低、高剂量组大鼠在药物干预第3、7天时的神经功能评分均显著升高（$P<0.05$），且随着虾青素干预时间的延长，大鼠神经功能评分有升高的趋势。与同期虾青素高剂量组比

较，虾青素+ML385组大鼠在药物干预第1、3、7天时的神经功能评分均显著降低（$P<0.05$）。结果见表1。

表1　各组大鼠神经功能评分和炎症浸润评分的比较（$\bar{x}\pm s$，分）

组别	神经功能评分（n=14）			炎症浸润评分（n=4）
	第1天	第3天	第7天	
假手术组	16.70±0.68	16.50±0.71	16.80±0.42	0.46±0.03
模型组	9.20±1.03[a]	9.00±1.33[a]	9.20±1.69[a]	3.14±0.31[a]
虾青素低剂量组	10.00±1.25	10.70±1.70[b]	12.50±1.58[b]	2.58±0.28[b]
虾青素高剂量组	11.10±1.45[b]	11.80±1.93[b]	13.70±1.89[b]	1.63±0.21[b]
虾青素+ML385组	9.53±1.16[c]	9.72±1.66[c]	9.85±1.70[c]	2.95±0.29[c]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与虾青素高剂量组比较，$P<0.05$。

3.2　各组大鼠脑组织的病理形态

假手术组大鼠脑组织结构较为完整，细胞间质无明显水肿；模型组大鼠损伤区脑组织结构受损，水肿明显，可见大量炎症细胞浸润，其炎症浸润评分较假手术组显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，虾青素低、高剂量组大鼠损伤区脑组织有不同程度改善，水肿现象逐渐减轻，炎症细胞逐渐减少，其炎症浸润评分均较模型组显著降低（$P<0.05$），且以虾青素高剂量组效果更好。虾青素+ML385组大鼠的脑组织病理形态与模型组相似，其炎症浸润评分较虾青素高剂量组显著升高（$P<0.05$）。结果见表1、图1。

3.3　各组大鼠脑组织神经细胞的超微结构

假手术组大鼠脑组织神经细胞中各细胞器形态和结构均较完整，神经细胞超微结构基本正常；模型组大鼠脑组织中各细胞器形态受损明显，数量明显减少，神经细胞超微结构破坏严重；虾青素低剂量组大鼠上述症状有逐渐好转趋势，虾青素高剂量组大鼠脑组织中各细胞器受损形态及神经细胞超微结构均明显好转，且接近于假手术组。虾青素+ML385组大鼠上述症状与模型组相似。结果见图2。

3.4　各组大鼠脑组织中氧化应激相关指标含量

与假手术组比较，模型组大鼠脑组织中SOD、CAT、GSH-Px、NO含量均显著降低，MDA含量显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，虾青素低、高剂量组大鼠脑组织中SOD、CAT、GSH-Px（低剂量组除外）、NO含量均显著升高，MDA含量均显著降低，且上述指标（GSH-Px除外）的变化均有剂量依赖性（$P<0.05$）。与虾青素高剂量组比较，虾青素+ML385组大鼠脑组织中SOD、CAT、GSH-Px、NO含量均显著降低，MDA含量显著升高（$P<0.05$）。结果见表2。

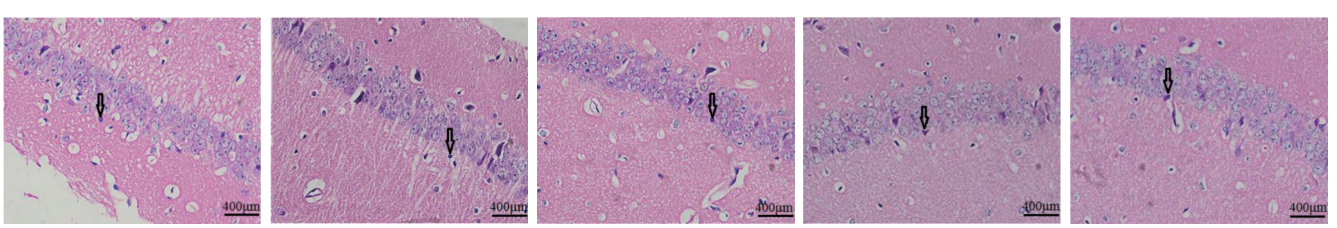
表2　各组大鼠脑组织中氧化应激相关指标含量的比较（$\bar{x}\pm s$，n=10）

组别	SOD/(U/g)	CAT/(U/g)	GSH-Px/(U/mg)	MDA/(nmol/g)	NO/(μmol/g)
假手术组	19.13±1.62	3.63±0.55	182.67±14.22	8.32±1.21	2.91±0.45
模型组	9.09±1.15[a]	2.23±0.67[a]	148.87±26.43[a]	17.85±2.78[a]	1.38±0.66[a]
虾青素低剂量组	13.74±1.40[b]	2.86±0.55[b]	166.43±15.41	14.36±2.45[b]	1.97±0.52[b]
虾青素高剂量组	16.87±1.59[bc]	3.59±0.82[bc]	177.69±17.33[b]	10.04±1.23[bc]	2.59±0.35[bc]
虾青素+ML385组	11.44±1.32[d]	2.50±0.71[d]	152.19±18.02[d]	16.55±2.27[d]	1.46±0.59[d]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与虾青素低剂量组比较，$P<0.05$；d：与虾青素高剂量组比较，$P<0.05$。

3.5　各组大鼠脑组织中炎症反应相关指标含量

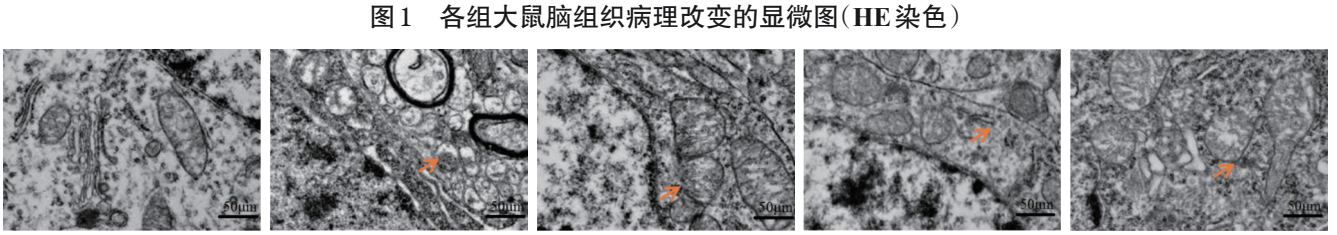
与假手术组比较，模型组大鼠脑组织中TNF-α、IL-1β、IL-6、iNOS含量均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，虾青素低、高剂量组大鼠脑组织中TNF-α、IL-1β、IL-6、iNOS含量均显著降低，且上述指标的变化均有剂量依赖性（$P<0.05$）。与虾青素高剂量组比较，虾青素+ML385组大鼠脑组织中TNF-α、IL-1β、IL-6、iNOS含量均显著升高（$P<0.05$）。结果见表3。



A.假手术组　B.模型组　C.虾青素低剂量组　D.虾青素高剂量组　E.虾青素+ML385组

箭头：炎症细胞浸润。

图1　各组大鼠脑组织病理改变的显微图（HE染色）



A.假手术组　B.模型组　C.虾青素低剂量组　D.虾青素高剂量组　E.虾青素+ML385组

箭头：受损细胞器。

图2　各组大鼠脑组织神经细胞超微结构的电镜扫描图

表3　各组大鼠脑组织中炎症反应相关指标含量的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	TNF-α/(pg/mg)	IL-1β/(pg/mg)	IL-6/(pg/mg)	iNOS/(ng/mg)
假手术组	2.59±0.44	5.40±1.45	3.74±0.75	84.39±5.31
模型组	9.52±0.77[a]	12.63±1.17[a]	11.78±1.06[a]	195.64±9.67[a]
虾青素低剂量组	6.69±0.92[b]	10.04±1.65[b]	7.85±1.26[b]	145.69±9.52[b]
虾青素高剂量组	5.11±0.64[bc]	7.92±1.07[bc]	6.19±0.94[bc]	102.35±7.74[bc]
虾青素+ML385组	8.44±0.82[d]	11.06±1.25[d]	9.83±1.17[d]	172.65±10.55[d]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与虾青素低剂量组比较，$P<0.05$；d：与虾青素高剂量组比较，$P<0.05$。

3.6　各组大鼠脑组织中Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA相对表达水平的比较

与假手术组比较，模型组大鼠脑组织中Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA的相对表达水平均显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，虾青素低、高剂量组大鼠脑组织中Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA的相对表达水平均显著升高，且上述指标的变化均有剂量依赖性（$P<0.05$）。与虾青素高剂量组比较，虾青素+ML385组大鼠脑组织中Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA的相对表达水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表4。

表4　各组大鼠脑组织中Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA相对表达水平的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	Nrf2 mRNA	HO-1 mRNA	NQO1 mRNA
假手术组	1.12±0.22	1.33±0.33	1.18±0.13
模型组	0.78±0.15[a]	1.06±0.10[a]	0.95±0.08[a]
虾青素低剂量组	1.02±0.09[b]	1.80±0.19[b]	1.49±0.06[b]
虾青素高剂量组	1.31±0.16[bc]	2.46±0.32[bc]	1.97±0.12[bc]
虾青素+ML385组	0.83±0.11[d]	1.35±0.13[d]	1.26±0.10[d]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与虾青素低剂量组比较，$P<0.05$；d：与虾青素高剂量组比较，$P<0.05$。

3.7　各组大鼠Nrf2/HO-1信号通路相关蛋白相对表达水平的比较

与假手术组比较，模型组大鼠脑组织中Nrf2、HO-1、NQO1蛋白的相对表达水平均显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，虾青素低、高剂量组大鼠脑组织中Nrf2、HO-1、NQO1蛋白的相对表达水平均显著升高，且上述指标的变化均有剂量依赖性（$P<0.05$）。与虾青素高剂量组比较，虾青素+ML385组大鼠脑组织中Nrf2、HO-1、NQO1蛋白的相对表达水平显著降低（$P<0.05$）。结果见表5、图3。

表5　各组大鼠Nrf2/HO-1信号通路相关蛋白相对表达水平的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	Nrf2/β-actin	HO-1/β-actin	NQO1/β-actin
假手术组	1.09±0.14	1.14±0.09	1.16±0.10
模型组	0.47±0.04[a]	0.62±0.08[a]	0.69±0.07[a]
虾青素低剂量组	0.59±0.08[b]	0.81±0.07[b]	0.95±0.09[b]
虾青素高剂量组	0.75±0.11[bc]	0.93±0.08[bc]	1.06±0.09[bc]
虾青素+ML385组	0.52±0.06[d]	0.74±0.08[d]	0.80±0.08[d]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与虾青素低剂量组比较，$P<0.05$；d：与虾青素高剂量组比较，$P<0.05$。

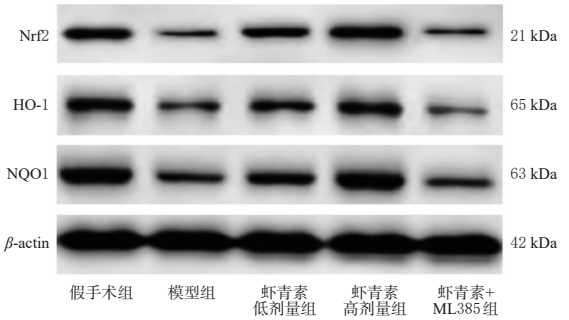


图3　各组大鼠Nrf2/HO-1信号通路相关蛋白表达的电泳图

4　讨论

TBI是由于机械性冲击致脑组织严重损伤的一类疾病，包括原发性和继发性脑损伤[15]。研究表明，继发性脑损伤是原发性脑损伤后慢性神经变性及神经功能损伤的主要机制，可进一步加重患者的脑损伤程度，是导致患者神经功能障碍和死亡的重要原因之一，而氧化应激是继发性脑损伤的核心病理环节[6,16-17]。因此，改善氧化应激对TBI的治疗具有重要意义。作为纯天然抗氧化剂，虾青素的抗氧化活性较其他类胡萝卜素类成分更强，且具有清除自由基、保护神经等作用，已成为近年来的研究热点[18]。研究表明，虾青素能减轻脑出血大鼠的炎症反应和脑水肿，提高其血脑屏障通透性并减轻神经功能损伤[19]。本研究采用改良Feeney自由落体撞击法构建TBI大鼠模型，结果显示，模型组大鼠的神经功能评分显著低于假手术组，虾青素低、高剂量组的神经功能评分明显高于模型组，且随着虾青素浓度的升高和药物干预时间的延长，神经功能评分也有升高的趋势。这说明，虾青素对TBI大鼠的神经功能有一定的改善作用。

本研究进一步探讨了虾青素对TBI大鼠脑组织及神经细胞的影响，结果显示，虾青素低、高剂量组大鼠脑组织水肿、炎症细胞浸润程度均有所减轻，其炎症浸润评分较模型组显著降低；同时，虾青素低、高剂量组大鼠神经细胞各细胞器受损形态及超微结构均有所好转，且高剂量组与假手术组相似。这表明，虾青素能有效改善TBI大鼠脑组织及神经细胞的病理状态。

研究表明，TBI后机体会发生氧化应激反应，可产生大量的活性氧，当活性氧的生成量超过机体清除能力时，细胞内脂质蛋白会被大量自由基氧化，从而导致细胞损伤和死亡[20]。其中，SOD是机体内重要的抗氧化因子，当其含量降低时，机体的抗氧化能力也随之减弱；CAT、GSH-Px含量间接反映了机体清除氧自由基的能力；MDA是系统氧化应激损伤的主要标志物之一，其可造成血管内皮损伤，从而导致NO分泌减少，血管收缩功能受损[21-22]。本研究结果显示，虾青素可显著升高TBI大鼠脑组织中SOD、CAT、GSH-Px、NO含量，降低MDA含量，且上述指标（GSH-Px除外）的变化均有剂量依赖

性。这表明，虾青素可有效减轻TBI大鼠的氧化应激反应。

TBI损伤发生后，加剧的炎症反应可破坏血脑屏障、损伤血管内皮细胞，从而进一步加重脑损伤[23]。既往研究表明，TBI大鼠脑组织中TNF-α、IL-1β、IL-6等炎症细胞因子呈过量表达，从而介导了脑组织炎症反应和继发性脑损伤[24]。本研究结果显示，虾青素低、高剂量组大鼠脑组织中TNF-α、IL-1β、IL-6、iNOS含量均显著低于模型组，且有剂量依赖性。这表明，虾青素可有效减轻TBI大鼠的炎症反应。

Nrf2/HO-1信号通路与多种组织器官的氧化应激损伤密切相关，在正常生理情况下，Nrf2被Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1（Kelch-like ECH-associated protein 1，Keap1）固定在细胞质中，因发生泛素化而被蛋白酶体快速降解；在氧化应激状态下，Nrf2可从Keap1中释放并进入细胞核内，与抗氧化反应元件结合并发挥抗氧化作用，活化的Nrf2可调控下游抗氧化因子表达，其下游关键靶点HO-1、NQO1表达的上调对抑制氧化还原反应和对抗外来有害物质侵袭具有重要作用[25—26]。本研究结果显示，与假手术组比较，模型组大鼠脑组织中Nrf2、HO-1、NQO1蛋白及mRNA的相对表达水平均显著降低；与模型组比较，虾青素低、高剂量组上述指标均剂量依赖性地上升。为了明确激活的Nrf2/HO-1信号通路是否参与了虾青素的神经保护作用，本研究联合应用Nrf2抑制剂ML385和虾青素进行干预，结果显示，与虾青素高剂量组比较，虾青素+ML385组大鼠的神经功能评分，SOD、CAT、GSH-Px、NO含量和Nrf2、HO-1、NQO1蛋白及mRNA的相对表达水平均显著降低，炎症浸润评分、MDA含量、炎症反应相关指标含量均显著升高，其脑组织病理形态和神经细胞超微结构均与模型组相似，佐证了虾青素对TBI大鼠的神经保护作用与激活Nrf2/HO-1信号通路有关。

综上所述，虾青素可能通过激活Nrf2/HO-1信号通路而减轻TBI大鼠的氧化应激，缓解其神经功能损伤，降低炎症反应水平。

参考文献

[1] GALGANO M，TOSHKEZI G，QIU X C，et al. Traumatic brain injury：current treatment strategies and future endeavors[J]. Cell Transplant，2017，26(7)：1118-1130.

[2] KHELLAF A，KHAN D Z，HELMY A. Recent advances in traumatic brain injury[J]. J Neurol，2019，266(11)：2878-2889.

[3] 郑琳，候鹏飞，周曦，等. 虾青素在中枢神经系统疾病防治中的实验研究进展[J]. 现代预防医学，2017，44(24)：4497-4500，4516.
ZHENG L，HOU P F，ZHOU X，et al. Experimental research progress of astaxanth in prevention and treatment of central nervous system diseases[J]. Mod Prev Med，2017，44(24)：4497-4500，4516.

[4] ZHANG X S，LU Y，LI W，et al. Astaxanthin ameliorates oxidative stress and neuronal apoptosis via SIRT1/NRF2/Prx2/ASK1/p38 after traumatic brain injury in mice[J]. Br J Pharmacol，2021，178(5)：1114-1132.

[5] 林良烽. 虾青素对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠模型的神经保护作用[J]. 中国组织工程研究，2015，19(40)：6480-6484.
LIN L F. The neuroprotective effect of astaxanthin on newborn rat models of hypoxic-ischemic brain damage[J]. Chin J Tissue Eng Res，2015，19(40)：6480-6484.

[6] KHATRI N，THAKUR M，PAREEK V，et al. Oxidative stress：major threat in traumatic brain injury[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets，2018，17(9)：689-695.

[7] 顾媛媛，张淑香，周忠光，等. 基于Nrf2/HO-1信号通路探讨益气活血方对脑缺血损伤大鼠氧化应激反应的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2019，25(24)：30-35.
GU Y Y，ZHANG S X，ZHOU Z G，et al. Effect of Yiqi huoxue recipe on oxidative stress response in rats with cerebral ischemia injury based on Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae，2019，25(24)：30-35.

[8] 谢婷，颜雅婷，陈文奕，等. 虾青素激活Nrf2/HO-1通路对蓝光损伤视锥细胞的保护作用[J]. 中国现代应用药学，2022，39(1)：36-41.
XIE T，YAN Y T，CHEN W Y，et al. Protective effects of astaxanthin on blue light damaged cones through activating Nrf2/HO-1 pathway[J]. Chin J Mod Appl Pharm，2022，39(1)：36-41.

[9] 胡戈，曹建民，周海涛，等. 虾青素介导Nrf2信号通路减轻大强度运动诱导大鼠心肌细胞的凋亡[J]. 食品工业科技，2019，40(8)：266-271.
HU G，CAO J M，ZHOU H T，et al. Astaxanthin reduces myocardial cell apoptosis induced by high intensity training via activating Nrf2 in rats[J]. Sci Technol Food Ind，2019，40(8)：266-271.

[10] 陈澜，石京山，龚其海，等. 淫羊藿苷对大鼠创伤性脑损伤后白细胞介素1β和肿瘤坏死因子α的作用[J]. 中国新药与临床杂志，2017，36(4)：210-214.
CHEN L，SHI J S，GONG Q H，et al. Effects of icariin on IL-1β and TNF-α after traumatic brain injury in rats[J]. Chin J New Drugs Clin Remedies，2017，36(4)：210-214.

[11] 侯晓宁，张育昆，陈祉晴，等. 虾青素对D-半乳糖致衰老大鼠肾脏和心脏组织氧化损伤的修复作用[J]. 现代食品科技，2022，38(12)：146-153.
HOU X N，ZHANG Y K，CHEN Z Q，et al. Protective effects of astaxanthin against oxidative damage of the kidney and heart tissues in D-galactose induced aging rats[J]. Mod Food Sci Technol，2022，38(12)：146-153.

[12] 张蕾，冷玉芳，张天雪，等. Nrf2/HO-1信号通路在阿托伐他汀减轻小鼠肠缺血再灌注损伤中的作用[J]. 中华麻醉

学杂志，2021，41(6)：685-689.
ZHANG L，LENG Y F，ZHANG T X，et al. Role of Nrf2/HO-1 signaling pathway in atorvastatin-induced reduction of intestinal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. Chin J Anesthesiol，2021，41(6)：685-689.
[13] 胡晓芳，郑少锐，聂群，等. 英夫利昔单抗对创伤性脑损伤后神经功能的保护作用及机制研究[J]. 中华神经医学杂志，2022，21(6)：563-572.
HU X F，ZHENG S R，NIE Q，et al. Protective effect of infliximab on neurological function and its related mechanism in mice after traumatic brain injury[J]. Chin J Neuromed，2022，21(6)：563-572.
[14] 刘菲. Ghrelin调控炎性小体活化途径对实验性自身免疫性脑脊髓炎的神经保护作用及机制研究[D]. 沈阳：中国医科大学，2020.
LIU F. The experimental study of the neuroprotective effect of ghrelin on experimental autoimmune encephalomyelitis involving inflammasome activation[D]. Shenyang：China Medical University，2020.
[15] CAPIZZI A，WOO J，VERDUZCO-GUTIERREZ M. Traumatic brain injury：an overview of epidemiology，pathophysiology，and medical management[J]. Med Clin North Am，2020，104(2)：213-238.
[16] WANG H，ZHOU X M，WU L Y，et al. Aucubin alleviates oxidative stress and inflammation via Nrf2-mediated signaling activity in experimental traumatic brain injury[J]. J Neuroinflammation，2020，17(1)：188.
[17] 徐伟，谢之易，王泽旭，等. 核因子E2相关因子2对脑出血继发性损伤调控机制研究进展[J]. 中国现代神经疾病杂志，2022，22(10)：836-840.
XU W，XIE Z Y，WANG Z X，et al. The role of Nrf2 in the secondary brain injury after intracerebral hemorrhage [J]. Chin J Contemp Neurol Neurosurg，2022，22(10)：836-840.
[18] 郭新明，吴丽君，赵静，等. 虾青素补充与急性大强度运动对机体Nrf2抗氧化通路影响的研究[J]. 山东体育学院学报，2020，36(6)：111-118.
GUO X M，WU L J，ZHAO J，et al. Effect of astaxanthin supplementation and acute high-intensity exercise on the antioxidant pathway of Nrf2[J]. J Shandong Sport Univ，2020，36(6)：111-118.
[19] 周子薇，郑晓梅，先耀，等. 虾青素对脑出血大鼠的神经保护作用及机制[J]. 山东医药，2020，60(26)：6-9.
ZHOU Z W，ZHENG X M，XIAN Y，et al. Neuroprotective effect and mechanism of astaxanthin on rats with intracerebral hemorrhage[J]. Shandong Med J，2020，60(26)：6-9.
[20] 张启财，张赛，王永阁，等. Exendin-4对颅脑创伤大鼠认知功能及Nrf2信号通路的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志，2019，28(1)：33-37.
ZHANG Q C，ZHANG S，WANG Y G，et al. Effects of exendin-4 on cognitive function and Nrf2 signaling pathway in rats with traumatic brain injury[J]. Chin J Behav Med Brain Sci，2019，28(1)：33-37.
[21] 赵万里，詹世钦，陈江生，等. 葛根素对创伤性脑损伤大鼠抗凋亡影响的机制分析[J]. 中国社区医师，2019，35(21)：6-7.
ZHAO W L，ZHAN S Q，CHEN J S，et al. Mechanism analysis of the effect of puerarin on anti-apoptosis in rats with traumatic brain injury[J]. Chin Community Dr，2019，35(21)：6-7.
[22] 陈江生，陈保东，凌毕益，等. 葛根素通过Nrf2-ARE信号通路抵抗氧化应激对创伤性脑损伤的神经保护作用[J]. 卒中与神经疾病，2017，24(2)：91-94.
CHEN J S，CHEN B D，LING B Y，et al. Puerarin protects traumatic brain injury through Nrf2-ARE pathway to resist oxidative stress[J]. Stroke Nerv Dis，2017，24(2)：91-94.
[23] 李佳蕊，罗本燕. 神经炎症反应在动物创伤性脑损伤中的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志，2019，46(2)：214-217.
LI J R，LUO B Y. Research progress of neuroinflammatory reaction in traumatic brain injury in animals[J]. J Int Neurol Neurosurg，2019，46(2)：214-217.
[24] 王星，余万，黄保胜. 异甘草素通过TLR4-TBK1-IKKε信号通路对创伤性脑损伤大鼠脑内炎症反应的影响[J]. 安徽医科大学学报，2021，56(2)：277-282.
WANG X，YU W，HUANG B S. Effect of isoliquiritigenin on the brain inflammation with traumatic brain injury in rat via TLR4-TBK1-IKKε signaling pathway[J]. Acta Univ Med Anhui，2021，56(2)：277-282.
[25] 张茹，曲中原，杜娟. 葡萄籽原花青素通过Nrf2/HO-1通路减轻镉诱导的幼龄大鼠认知功能损伤[J]. 中药药理与临床，2021，37(4)：32-36.
ZHANG R，QU Z Y，DU J. Proanthocyanidins in grape seeds protects against cadmium-induced cognitive impairment in young rats by regulating Nrf-2/HO-1 pathway[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med，2021，37(4)：32-36.
[26] 郭瑞俊，郭佩俊，韩云彪，等. 基于氧化应激探讨Nrf2/HO-1信号通路与临床疾病关系研究进展[J]. 河北医药，2022，44(20)：3157-3162.
GUO R J，GUO P J，HAN Y B，et al. Research progress on the correlation between Nrf2/HO-1 signal pathway and clinical diseases based on oxidative stress[J]. Hebei Med J，2022，44(20)：3157-3162.

（收稿日期：2023-01-04　修回日期：2023-09-01）
（编辑：张元媛）